

**Identifizierung neuer Zielgene des Hitzeschockregulators Phr und
Charakterisierung des Regulators des Schwefelstoffwechsels SurR aus
*Pyrococcus furiosus***



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Annette Keese

aus Hannover

Regensburg, im Februar 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.02.2009

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Thomm

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

1. Gutachter und Prüfer:

2. Gutachter und Prüfer:

3. Prüfer:

Prof. Dr. R. Wirth

Prof. Dr. M. Thomm

Prof. Dr. R. Sterner

Prof. Dr. H. Tschochner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
I Einleitung	4
1. Die Transkription bei Archaeen	4
2. Die Regulation der Transkription in Archaeen.....	6
3. Der Transkriptionsregulator Phr.....	8
4. Der Transkriptionsregulator SurR	11
II Material	15
1. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien.....	15
1.1 Chemikalien.....	15
1.2 Enzyme und andere Proteine	16
1.3 Kits	16
2. Archaeenstamm	16
3. Plasmide	16
4. Oligonukleotide	17
III Methoden.....	18
1. Reinigung der RNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	18
2. Erstellung von Matrizen für die <i>in vitro</i> Transkription mittels PCR.....	19
3. Präparation genomischer DNA aus <i>Pyrococcus furiosus</i> für die <i>in vitro</i> Transkription	19
4. <i>In vitro</i> Transkription spezifischer Gene	19
5. <i>In vitro</i> Transkription chromosomaler DNA von <i>Pyrococcus furiosus</i>	20
5.1 Die genomische <i>in vitro</i> Transkription.....	20
5.2 Aufreinigung der RNA durch DNase-Verdau	21
5.3 Filtration der RNA.....	21
6. Markierung der Oligonukleotide für Primer Extension-Experimente.....	21
7. Primer Extension	21

8.	Markierung der RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	22
9.	Microarray-Analyse (Schut et al., 2003)	22
10.	Eletrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	23
IV	Ergebnisse	24
1.	Untersuchungen des Hitzeschockregulators Phr durch ROMA	24
1.1	Etablierung des genomischen <i>in vitro</i> Transkriptionssystems	24
1.2	Analyse der genomischen <i>in vitro</i> Transkriptionen durch Primer Extension- Experimente.....	26
1.3	Das ROMA-Experiment.....	27
1.4	Spezifische Transkriptionen der von Phr regulierten Gene.....	31
1.5	Alignment der Promotorregion der von Phr regulierten Gene	34
1.6	Analyse der Promotoren der von Phr regulierten Gene.....	36
1.7	Analyse der Bindestellen von Phr am Gen der <i>myo</i> -Inositol-1-phosphat- Synthase.....	36
1.8	Analyse des Genoms von <i>Pyrococcus furiosus</i> nach der Bindestelle von Phr	38
1.9	BLAST-Analyse der hypothetischen Proteine	41
2.	Untersuchungen zur Charakterisierung des Transkriptionsregulators SurR von <i>Pyrococcus furiosus</i>	43
2.1	SurR reguliert die Transkription als Aktivator und Repressor	43
2.2	SurR reguliert die Transkription seines eigenen Gens	45
2.3	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der von SurR regulierten Gene ..	47
2.4	Die Aktivität von SurR wird durch zwei redox-aktive SH-Gruppen beeinflusst.....	49
V	Diskussion.....	52
1.	ROMA ermöglicht die Identifikation von sechs neuen Genen, die von Phr reguliert werden	52
2.	Die Rolle von Phr bei der Hitzeschockantwort	54
3.	Vorteile und Grenzen des ROMA-Experiments.....	55
4.	SurR beeinflusst die <i>in vitro</i> Transkription als Aktivator und als Repressor	56
5.	Die Bindeaktivität von SurR wird durch einen Redoxschalter beeinflusst	59
6.	Die Rolle von SurR im Stoffwechsel von <i>Pyrococcus furiosus</i>	60

VI	Zusammenfassung	62
VII	Summary	64
VIII	Literaturverzeichnis	66
IX	Anhang.....	73
1.	Abkürzungen	73
2.	Danksagung	75
3.	Erklärung	76

I Einleitung

Die Archaeen repräsentieren neben den Eukaryoten und den Bakterien eine der drei Domänen des Lebens (Woese et al., 1990). Sie gehören zu den Prokaryoten. Obwohl sie auch in gemäßigten Biotopen vorkommen, zeichnen sich viele Archaeen durch ihre Anpassung an besonders extreme Bedingungen aus. So findet man unter ihnen hyperthermophile, sowie auch extrem acidophile, alkaliphile und halophile Organismen. Diese Eigenschaften machen sie zu interessanten Forschungsobjekten.

Einer ihrer Vertreter ist *Pyrococcus furiosus*, welcher von Fiala und Stetter, 1986 in geothermal erhitzten Sedimenten vor der Insel Vulcano in Italien entdeckt wurde. Er gehört zum Stamm der *Euryarchaeota* und wird zur Klasse der *Thermococci* gezählt. Sein Genom besitzt eine Größe von ungefähr 1.9 Mb und enthält 2192 offene Leseraster (Poole et al., 2005).

Das hyperthermophile Archaeon besitzt eine Größe von 0,8 bis 2,5 μm und ist monopolar, polytrich begeißelt. Seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei 100°C. Bei *Pyrococcus furiosus* handelt es sich um einen strikt anaeroben, heterotrophen Organismus, der auf Stärke, Maltose, Pepton und komplexen organischen Substraten wächst. Dabei bildet er CO_2 und H_2 und wenn Schwefel vorhanden ist auch H_2S (Fiala and Stetter, 1986).

Aufgrund seines Habitats muss sich *Pyrococcus furiosus* immer wieder an wechselnde Umweltbedingungen, wie Temperaturschwankungen oder unterschiedliche Nährstoffkonzentrationen, anpassen. Dies geschieht zuerst auf der Ebene der Transkription, welche von verschiedenen Transkriptionsregulatoren kontrolliert wird.

Mit der Untersuchung und Charakterisierung zwei dieser Transkriptionsregulatoren von *Pyrococcus furiosus* beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Dabei handelt es sich um den Hitzeschockregulator Phr und den Regulator des Schwefelstoffwechsels SurR.

1. Die Transkription bei Archaeen

Die Transkription ist ein wichtiger Prozess innerhalb der Genexpression und beschreibt die Synthese der RNA von einer DNA-Matrize. Dieser Vorgang wird von unterschiedlichen Proteinen durchgeführt und reguliert.

Für eine Transkription im archaeellen *in vitro* System werden die Transkriptionsfaktoren TBP (TATA-Box-Bindeprotein) und TFB (Transkriptionsfaktor B) sowie die RNA-Polymerase (RNAP) benötigt (Bell und Jackson, 2001). Die archaeellen Transkriptionsfaktoren besitzen Homologe zu eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Auch die archaeelle RNAP ähnelt in ihrem Aufbau der eukaryotischen RNAP II. Allerdings besitzen die Archaeen wie die Bakterien nur eine RNA-Polymerase im Gegensatz zu den Eukaryoten, die drei (RNAP I, II und III) aufweisen (Thomm, 1996; Thomm et al., 2009). Während jedoch bei Bakterien die Transkription durch die Sigma-Faktoren initiiert wird (Campbell et al., 2008), sind bei Archaeen die beiden Transkriptionsfaktoren TBP und TFB essentiell für eine spezifische Transkription (Geiduschek und Ouhammouch, 2005). Bei den Eukaryoten sind außer den Homologen des archaeellen TBP und TFB noch weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt. Der archaeelle Transkriptionsapparat stellt somit eine vereinfachte Form der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie dar (Bell und Jackson, 1998; Thomm, 1996).

Der Transkriptionsmechanismus der Archaeen läuft in mehreren Schritten ab. Zu Beginn bindet TBP an die TATA-Box (Bell und Jackson, 2000b). Diese befindet sich ungefähr 25

Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Hausner und Thomm, 2001). Danach erfolgt die Bindung von TFB an das BRE (Faktor B Recognition Element). Dies ist eine purinreiche Sequenz stromaufwärts der TATA-Box. Nun erfolgt die Assoziation der RNA-Polymerase an die Promoterregion. Damit hat sich ein Initiationskomplex gebildet, und die Transkription kann beginnen (Bartlett, 2005; Bell et al., 2001).

Um den Mechanismus und die Regulation der Transkription zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Transkriptionssystem für *Pyrococcus furiosus* entwickelt (Hethke et al., 1996). Mit diesem war es möglich, einzelne Gene zu transkribieren. Dabei wurden rekombinantes TFB und TBP sowie endogene Polymerase eingesetzt. In diesem System konnten Transkriptionsregulatoren wie LrpA und Phr untersucht und ihre Funktion bei der Kontrolle der Transkription einzelner Gene nachgewiesen werden (Dahlke und Thomm, 2002; Vierke et al., 2003).

Um sämtliche Gene zu erfassen, die von einem Transkriptionsregulator kontrolliert werden, ist es notwendig, eine Transkriptionsanalyse durchzuführen, die sich über das gesamte Genom eines Organismus erstreckt. Dafür wird eine *in vitro* Transkription, in welche chromosomale DNA als Matrize eingesetzt wird, mit und ohne Regulator durchgeführt. Die daraus hervorgehenden RNA-Pools müssen zur Identifikation der regulierten Gene miteinander verglichen werden. Dies geschieht durch eine Microarray-Analyse. Mit dieser Technologie ist es möglich, die Konzentrationen der RNA eines bestimmten Gens aus den beiden RNA-Pools miteinander zu vergleichen und so eine Hemmung oder Aktivierung dieses Gens durch den Regulator zu erkennen. Außerdem ermöglicht die Microarray-Analyse, mit einem Experiment mehrere Gene gleichzeitig zu untersuchen und somit das Regulon eines Transkriptionsregulators zu bestimmen.

Dieses System, bestehend aus *in vitro* Transkription und Microarray-Analyse, nennt sich ROMA (run-off transcription-microarray analysis) und wurde von (Cao et al., 2002) für das Bakterium *Bacillus subtilis* etabliert und beschrieben. Dabei gelang es die Regulons unterschiedlicher σ -Faktoren zu bestimmen (Cao und Helmann, 2004; Cao et al., 2003).

ROMA wurde auch bei der Analyse eines Transkriptionsregulators von *Escherichia coli* angewendet. Dabei wurde das „cyclic AMP receptor protein“ (CRP) untersucht. Dieser Regulator beeinflusst die Transkription von mehr als 100 Genen (Zheng et al., 2004).

Für das Archaeon *Methanocaldococcus jannaschii* ist ebenfalls ein *in vitro* Transkriptionssystem entwickelt worden, bei dem chromosomale DNA als Matrize diente. Die Analyse der Transkripte erfolgte durch Primer Extension-Experimente. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsregulator Ptr2 das Gen *rb2* nicht nur im einfachen Transkriptionssystem mit einer einzelnen kurzen Promotor-DNA als Matrize aktiviert, sondern auch in einem komplexen Ansatz, bei dem die Bindestelle des *rb2* Promotors in Konkurrenz zu Bindestellen aus dem gesamten Genom steht (Ouhammouch et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* System zur Transkription chromosomaler DNA von *Pyrococcus furiosus* etabliert. Dieses diente der Bestimmung des Regulons des Hitzeschockregulators Phr. Die Identifikation der regulierten Gene erfolgte durch Microarray-Analyse. Es handelt sich dabei um das erste ROMA-Experiment bei Archaeen.

Um das neue Transkriptionssystem für chromosomale DNA vom Standard-System zu unterscheiden, wird es als „genomisches Transkriptionssystem“ beschrieben.

2. Die Regulation der Transkription in Archaeen

Die meisten Transkriptionsregulatoren der Archaeen weisen Homologien zu bakteriellen Proteinen auf. Es gibt aber auch archaeenspezifische Regulatoren und auch einige wenige, welche nur zu eukaryotischen Proteinen Homologien aufweisen.

Transkriptionsregulatoren beeinflussen die Transkription durch unterschiedliche Regulationsmechanismen. Dabei binden sie an eine spezifische Sequenz im Promotorbereich und beeinträchtigen dadurch die Assoziation der Transkriptionsfaktoren oder der RNA-Polymerase an die DNA. Dabei unterscheidet man zwischen Repressoren, welche die Expression eines Gens hemmen und Aktivatoren, welche die Expression anregen. Ein weiteres charakteristisches Merkmal eines Transkriptionsregulators ist sein jeweiliger Effektor, welcher die Bindeaffinität eines Regulators an die DNA beeinflusst (Bell, 2005; Geiduschek und Ouhammouch, 2005).

In diesem Abschnitt werden einige archaeele Transkriptionsregulatoren kurz vorgestellt. Ihre wichtigsten Charakteristika sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Bis heute sind insgesamt fünf Transkriptionsregulatoren von *Pyrococcus furiosus* genauer charakterisiert und beschrieben worden. Einer davon ist LrpA (leucine-responsive regulatory protein A). Dieses Protein ist wie viele andere Transkriptionsregulatoren der Archaeen homolog zu bakteriellen Lrp/AsnC-Proteinen. LrpA wirkt als Autoregulator, indem es die Transkription seines eigenen Gens hemmt. Dabei verhindert LrpA die Assoziation der RNAP an den Promotor (Brinkman et al., 2000; Dahlke und Thomm, 2002).

Pyrococcus furiosus besitzt insgesamt vier Vertreter der TrmB-Proteine. Von diesen sind TrmB und TrmBL1 am besten untersucht worden. TrmB reguliert die Transkription der Gene des Trehalose/Maltose ABC-Transporters (TM System) und des Maltodextrin ABC-Transporters (MD-System). Dabei wirken verschiedene Zucker als Effektoren, indem sie die Bindeaktivität von TrmB beeinflussen. Es ist hierbei vom jeweiligen Promotor abhängig, ob TrmB bindet. Der Regulator hemmt die Transkription, indem er die Bindung von TBP und TFB verhindert (Lee et al., 2005; Lee et al., 2007b).

TrmBL1 kann sowohl als Aktivator wie auch als Repressor fungieren. Der Regulator hemmt die Gene des MD-Systems und aktiviert Gene, welche für Enzyme der Glyconeogenese codieren. Dabei wirken Maltose und Maltotriose als Effektoren. TrmBL1 erkennt unter anderem das TGM (Thermococcales-Glycolytic-Motif). Dabei handelt es sich um eine konservierte Sequenz, die sich stromaufwärts der Gene des MD-Systems und der an der Glyconeogenese beteiligten Enzyme befindet. Sie befindet sich stromabwärts der TATA-Box und überlappt den Transkriptionsstart (Lee et al., 2008; Lee et al., 2007a). TrmB-Proteine sind bis jetzt ausschließlich bei Archaeen beschrieben worden. Dazu gehört der Transkriptionsregulator Tgr von *Thermococcus kodakaraensis*. Dieser ist homolog zu TrmBL1 von *Pyrococcus furiosus*. Microarray-Analysen einer Δtgr -Mutante deuten darauf hin, dass er bei der Regulation des Maltodextrinstoffwechsels und der Glyconeogenese eine Rolle spielt, wobei er als Aktivator und auch als Repressor fungiert. Als Bindestelle dient dabei das TGM, welches sich vor oder hinter der BRE/TATA Sequenz der regulierten Gene befindet (Kanai et al., 2007).

Auf zwei weitere Transkriptionsregulatoren von *Pyrococcus furiosus*, Phr und SurR, wird in den nächsten beiden Abschnitten genauer eingegangen.

Auch von anderen Archaeen wurden zahlreiche Transkriptionsregulatoren beschrieben.

Einer ist der Repressor MDR1 (metal-dependent-repressor) von *Archaeoglobus fulgidus*. Er ist homolog zu dem bakteriellen, metallabhängigen Transkriptionsrepressor DtxR. MDR1 hemmt die Transkription seines eigenen Gens, indem er die Assoziation der Polymerase an den Promotor blockiert. Dabei wirken verschiedene Metallionen (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}) als Effektoren (Bell et al., 1999).

NrpR von *Methanococcus maripaludis* ist ebenfalls ein Repressor. Dieses Helix-Turn-Helix-Protein besitzt ausschließlich euryarchaeelle Homologe. Es kontrolliert die Expression des *nif* (nitrogen fixation)-Operons, indem es an die beiden Operatoren OR₁ und OR₂ bindet. Diese befinden sich stromabwärts des Transkriptionsstarts. 2-Oxygluterat dient dabei als Effektor. Dieses Molekül hemmt die Affinität von NrpR an die DNA (Lie und Leigh, 2003; Lie et al., 2005).

Sulfolobus solfataricus besitzt drei Repressoren, welche homolog zum bakteriellen Lrp sind. Lrs14 hemmt die Transkription seines eigenen Gens, indem es die Bindung von TBP und TFB an den Promotor hemmt (Bell und Jackson, 2000a; Napoli et al., 1999). Es wurde nachgewiesen, dass die beiden anderen Regulatoren, Ss-LrpB und Ss-Lrp, ebenfalls an die Promotorregion binden und so die Transkription ihres eigenen Gens negativ regulieren (Enoru-Eta et al., 2002; Peeters et al., 2004).

Ein weiterer Repressor ist TrpY von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. Er reguliert die Transkription, indem er an eine spezifische Sequenz die TRP-Box bindet. Sobald kein Tryptophan vorliegt, bindet TrpY an den Promotor seines eigenen Gens und verhindert so die Transkription. In der Gegenwart von Tryptophan hemmt TrpY auch die Transkription des Operons *trpEGCFBAD* (Xie und Reeve, 2005).

Name	Organismus	Regulation	Effektor	Regulationsmechanismus	Referenz
Bat	<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	Aktivator	wahrscheinlich Licht Sauerstoff	unbekannt	(Baliga et al., 2001)
GvpE	<i>Halobacterium salinarum</i> <i>Haloferax mediterranei</i>	Aktivator	unbekannt	unbekannt	(Bauer et al., 2008; Kruger et al., 1998)
LrpA	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor	unbekannt	Verhindert Bindung der RNAP	(Dahlke and Thomm, 2002)
Lrs14	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Repressor	unbekannt	Verhindert Bindung von TBP und TFB	(Bell and Jackson, 2000a)
LysM	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	möglicher Aktivator	Lysin	unbekannt	(Brinkman et al., 2002)
MDR1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Repressor	Metallionen	Verhindert Bindung der RNAP	(Bell et al., 1999)
NrpR	<i>Methanococcus maripaludis</i>	Repressor	2-Oxo-Gluterat	Verhindert wahrscheinlich Bindung der RNAP	(Lie et al., 2005)
Phr	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor	unbekannt	Verhindert Bindung der RNAP	(Vierke et al., 2003)
Ptr2	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Aktivator	unbekannt	Unterstützt Assoziation von TBP	(Ouhammouch et al., 2005)
Sta1	<i>Sulfolobus islandicus</i>	Aktivator	unbekannt	unbekannt	(Kessler et al., 2006)
Tgr	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Repressor +Aktivator	unbekannt	unbekannt	(Kanai et al., 2007)
TrmB	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor	Maltose Trehalose Maltotriose Sucrose Glucose	Verhindert Bindung von TBP und TFB	(Lee et al., 2008)
TrmBL1	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor +Aktivator	Maltose Maltotriose	unbekannt	(Lee et al., 2008)
TrpY	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	Repressor	Tryptophan	Verhindert die Bindung von TBP	(Xie and Reeve, 2005)

Tab. 1: Die Transkriptionsregulatoren der Archaeen (verändert nach Bell, 2005)
Aufstellung archaeeller Transkriptionsfaktoren und ihrer Charakteristika

Neben den Repressoren sind auch einige Aktivatoren der Transkription bei Archaeen beschrieben worden. Einer davon ist Ptr2 von *Methanocaldococcus jannaschii*. Dieses Archaeon besitzt zwei „putative transcription regulators“ Ptr1 und Ptr2, von denen beide zur Lrp/AsnC Familie gehören. Ptr2 wurde bereits genauer charakterisiert. Der Regulator aktiviert die Transkription des Gens *rb2* (*rubredoxin 2*), indem es die Bindung von TBP an eine schwache TATA-Box unterstützt. Dabei bindet Ptr2 an zwei Bereiche vor dem BRE und der TATA-Box, welche die UAS (upstream activating site) bilden (Ouhammouch et al., 2003; Ouhammouch et al., 2005).

Der Aktivator Bat von *Halobacterium* sp. NRC-1 erkennt ebenfalls eine UAS. Er ist an der Regulation von Genen, welche für den Aufbau der Purpurmembraan notwendig sind, beteiligt. Er besitzt eine photosensitive cGMP-Bindedomäne, eine redoxaktive PAS/PAC-Domäne und ein bakterielles AraC/Helix-Turn-Helix-Bindemotiv. Diese Struktur motive deuten darauf hin, dass wahrscheinlich Licht und Sauerstoff als Effektoren den Regulator beeinflussen (Baliga und DasSarma, 1999; Baliga et al., 2001).

Der Transkriptionsaktivator LysM gehört wie Ptr2 zu den Lrp-Proteinen. Er bindet stromaufwärts des BRE und der TATA-Box eines Genclusters, welches für die Lysin-Biosynthese verantwortlich ist. Lysin wirkt als Effektor, indem es die Bindung von LysM schwächt (Brinkman et al., 2002).

GvpE reguliert Gene, welche an der Gasvesikel-Formation der beiden halophilen Bakterien *Halobacterium salinarum* und *Haloferax mediterranei* beteiligt sind. Dabei aktiviert es zwei Promotoren, indem es an eine konservierte Sequenz stromaufwärts des BRE bindet. Außerdem ist GvpE homolog zu den eukaryotischen bZIP Transkriptionsregulatoren (Bauer et al., 2008; Kruger et al., 1998). GvpE tritt in Wechselwirkung mit dem Regulatorprotein GvpD, welches die Aktivität von GvpE unterdrückt und so als Repressor der Transkription wirkt (Hofacker et al., 2004; Scheuch und Pfeifer, 2007; Zimmermann und Pfeifer, 2003).

Des Weiteren wurde ein Transkriptionsregulator aus *Sulfolobus islandicus* beschrieben. Erste Untersuchungen des „*Sulfolobus* transcription activators 1“ (Stal) ergaben, dass dieses Protein Promotoren des Rudivirus SIRV1 aktiviert. Dabei bindet es an eine Region direkt im Promotorbereich und an eine Region stromaufwärts der TATA-Box (Kessler et al., 2006). Weitere Untersuchungen in *Sulfolobus solfataricus* ergaben, dass Stal nicht nur virale, sondern auch zelluläre Gene positiv reguliert. So wurde festgestellt, dass Stal wahrscheinlich in den DNA-Reparaturmechanismus eingreift, indem es die Transkription des Gens *ss0777* aktiviert, welches verstärkt während der SOS-Antwort exprimiert wird (Abella et al., 2007).

3. Der Transkriptionsregulator Phr

Der *Pyrococcus* heat shock regulator Phr wurde als erster archaeeller Hitzeschockregulator charakterisiert. Das Protein besitzt eine molare Masse von 24 kDa und liegt als Dimer vor. Phr reguliert *in vitro* und *in vivo* die Transkription der beiden Hitzeschockgene *hsp20* und *aaa⁺atpase* und wirkt dabei als Repressor. Außerdem hemmt Phr als Autoregulator die Transkription seines eigenen Gens. Durch EMSAs und DNaseI-Footprint-Experimente konnte der Regulationsmechanismus von Phr aufgeklärt werden. Der Regulator hemmt die Transkription, indem er stromabwärts der beiden Transkriptionsfaktoren TBP und TFB bindet. Dabei überlagert Phr den Transkriptionsstart und verhindert so die Assoziation der RNA-Polymerase an den Promotor. Die Transkription der am Hitzeschock beteiligten Gene wird dadurch verhindert (Vierke et al., 2003).

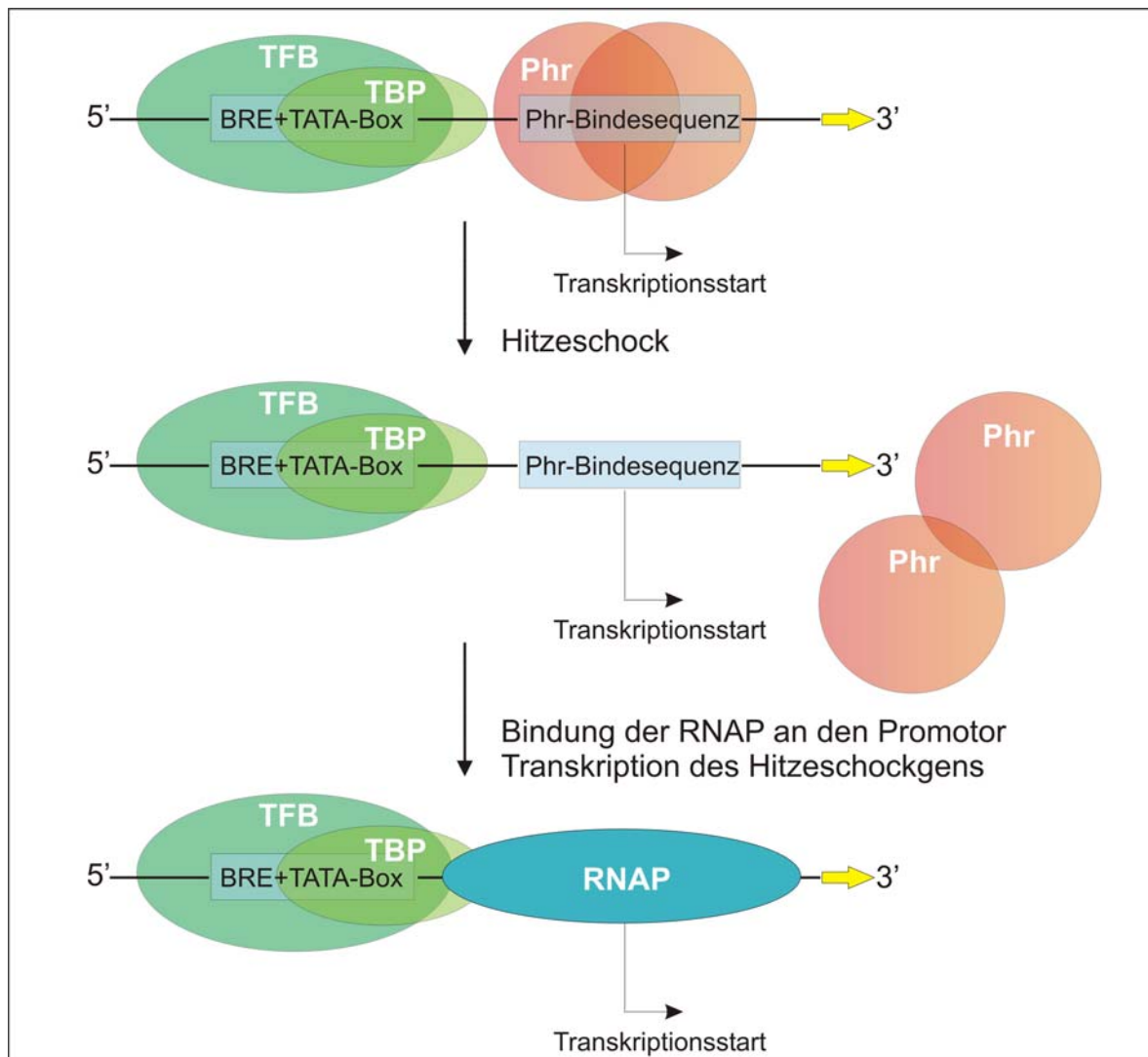


Abb. 1: Der Regulationsmechanismus des Transkriptionsregulators Phr

Unter normalen Wachstumsbedingungen bindet Phr an den Promotor des Hitzeschockproteins und hemmt die Transkription, indem es die Assoziation der RNA-Polymerase an den Transkriptionsstart verhindert. Unter Hitzeschockbedingungen verlässt Phr den Promotor. Die Assoziation der RNA-Polymerase an den Transkriptionsstart kann erfolgen, und das Hitzeschockgen wird transkribiert.

Durch Bindestudien und Sequenzanalysen wurden drei Motive als mögliche Bindesequenz für Phr identifiziert. Dabei handelt es sich um die Sequenz TTTA an Position -10, TGGTAA am Transkriptionsstart und AAAA an Position +10. Nach weiteren Untersuchungen wurde jedoch das Palindrom 5'-TTTnnTnnCnnnnnGnnAnnAAA-3' als Bindesequenz für Phr vorgeschlagen (Vierke et al., 2003).

Um die Regulation der Bindeaktivität von Phr *in vivo* zu untersuchen, wurden Chromatinimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Unter Wachstumsbedingungen bei 95°C konnte die Bindung von Phr an die drei Hitzeschockpromotoren der Gene *phr*, *aaa⁺atpase* und *hsp20* nachgewiesen werden. Setzte man die Zellen jedoch einem Hitzeschock von 107°C aus, konnte keine Bindeaktivität mehr nachgewiesen werden. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Phr als Thermosensor fungiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen hemmt der Regulator die Transkription der Hitzeschockgene. Sobald die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt werden, verliert Phr seine Bindeaffinität und fällt ab (Abb. 1). Damit kann die Transkription der am Hitzeschock beteiligten Gene erfolgen (Vierke, 2006).

In vivo Untersuchungen auf RNA-Ebene unterstützen diese Annahme. Diese zeigten einen deutlichen Anstieg der Expression der Gene *phr* und *aaa⁺atpase* unter Hitzeschockbedingungen. Dabei wurde die Konzentrationen der mRNA unter normalen Wachstumsbedingungen bei 95°C und unter Hitzestress bei 103°C miteinander verglichen. Westernblott-Analysen ergaben jedoch, dass auf Proteinebene kaum ein Unterschied zu beobachten ist. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Regulation der Hitzeschockantwort komplexer ist, als bisher angenommen (Vierke, 2006).

In weiteren Untersuchungen wurde die Struktur von Phr aufgeklärt. Es wurde festgestellt, dass Phr zur Gruppe der winged Helix-DNA-Bindeproteine gehört. Dabei handelt es sich um eine Untergruppe der Helix-Turn-Helix-Proteine. Die Strukturaufklärung ergab, dass Phr als Homodimer vorliegt. In Abbildung 2 ist die Struktur von Phr als Monomer und als Dimer dargestellt. Ein Monomer lässt sich in zwei Bereiche teilen. Der N-terminale Teil von Phr wird durch eine wH-DNA-Bindedomäne (wH-DBD) charakterisiert. Dem klassischen wHTH-Motiv aus drei α -Helices ist dabei eine vierte Helix N-terminal vorgelagert. Die DNA-Bindedomäne von Phr ähnelt der bakterieller Transkriptionsfaktoren der SmtB/ArsR-Familie. Sie ist positiv geladen und nimmt so Kontakt zu der negativ geladenen DNA auf. Der C-terminale Bereich von Phr besteht aus vier α -Helices. Dieser ist negativ geladen und es wird vermutet, dass er als Kontaktstelle für ein Protein dient (Liu et al., 2007).

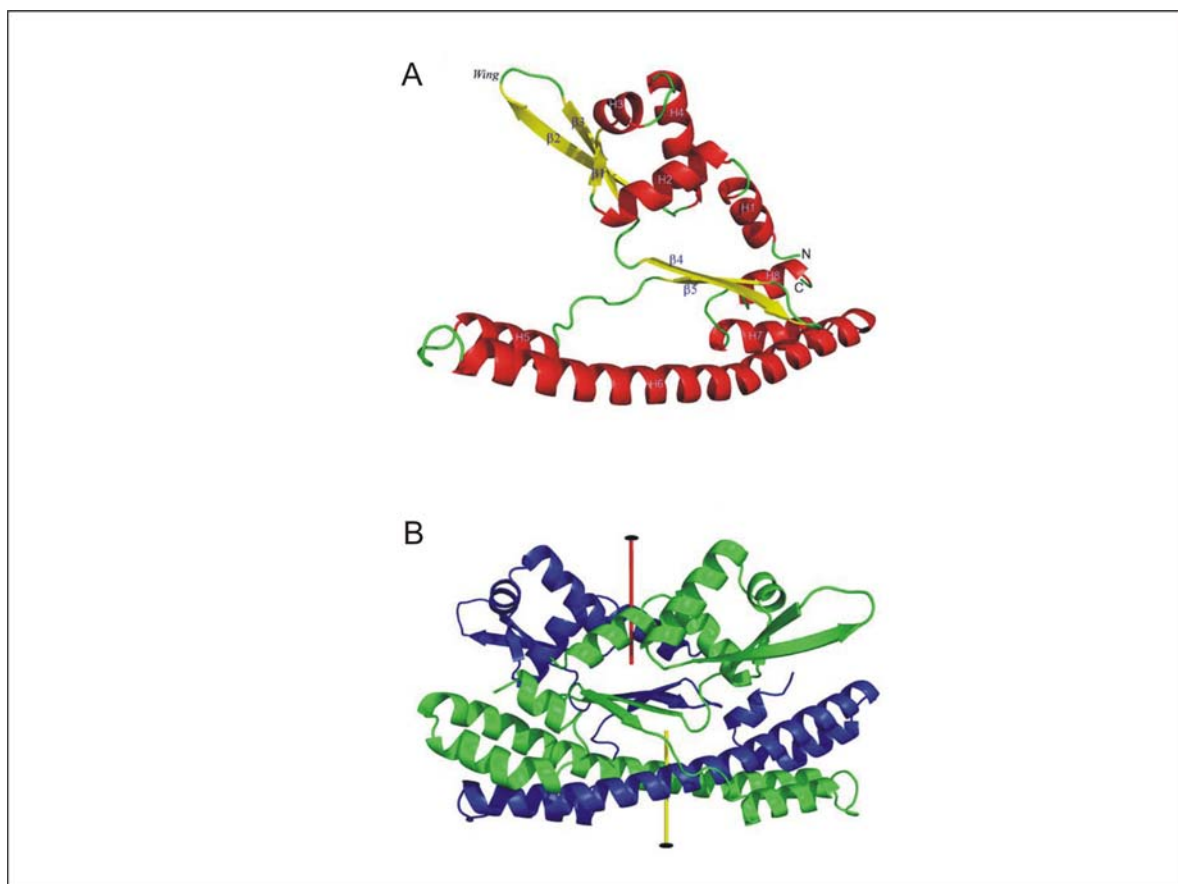


Abb. 2: Ribbon Modelle des Transkriptionsregulators Phr (Liu et al. 2007)

(A) Untereinheiten von Phr: α -Helices sind rot, β -Faltblätter gelb und Loops grün dargestellt.
 (B) Strukturmodell des Phr-Dimers. Die Untereinheiten sind blau bzw. grün dargestellt.

Um Phr genauer zu charakterisieren und neue Informationen über seine Rolle als Hitzeschockregulator zu erhalten, sollte das Regulon dieses Transkriptionsregulators bestimmt werden. Hierfür wurde Phr in ROMA-Experimente eingesetzt und untersucht.

4. Der Transkriptionsregulator SurR

Der Transkriptionsregulator SurR wurde erst vor kurzem entdeckt und beschrieben (Lipscomb et al., 2009). Dabei spielten Untersuchungen des Schwefelstoffwechsels von *Pyrococcus furiosus* eine große Rolle. Eine Besonderheit dieses Archaeons ist, dass es sowohl mit als auch ohne Schwefel wachsen kann (Adams et al., 2001). Um die Stoffwechselunterschiede bei diesem Vorgang genauer zu untersuchen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Dafür wurde *Pyrococcus furiosus* auf einem Maltosemedium mit und ohne Schwefel kultiviert. Microarray-Analysen ergaben, dass zehn Minuten nach der Zugabe von Schwefel eine primäre Antwort auf Transkriptionsebene zu beobachten ist. Dabei war die Hemmung der Expression von drei Hydrogenaseoperons besonders signifikant. Nach dreißig Minuten erfolgte eine sekundäre Antwort. Hier war eine Verstärkung der Transkription vieler Gene, die am Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind, zu beobachten (Schut et al., 2007).

Um die Regulierung des Schwefelstoffwechsels genauer zu analysieren, sollten Transkriptionsregulatoren, die ihn beeinflussen, identifiziert werden. Dazu wurde in einem Versuchsansatz Promotor-DNA als Bindestelle für potentielle Transkriptionsregulatoren genutzt. Es wurde die Promotorregion des Operons der membrangebundenen Hydrogenase I (*mbhI*, PF1423) verwendet, da in der Microarray-Analyse der Schwefelantwort die Expression dieses Gens besonders stark reprimiert wurde. Die Promotor-DNA wurde mit unterschiedlichen Zellextrakten von *Pyrococcus furiosus*, der mit und ohne Schwefel kultiviert wurde, inkubiert. Dabei sollten mögliche Transkriptionsregulatoren an den Promotor binden. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und danach durch SDS-PAGE analysiert. Zur genauen Identifikation wurden einige Proteine durch Massenspektroskopie und Sequenzanalyse genauer untersucht. Dabei wurde PF0095 als einziges Protein, welches in nur einem Zellextrakt vorlag und bereits als möglicher Transkriptionsregulator galt, identifiziert. Dieses Protein erhielt den Namen SurR, welcher für „sulfur response regulator“ steht (Lipscomb et al., 2009).

Um das Konsensusmotiv, welches von SurR erkannt wird und seine Bindung an die DNA bewirkt, zu identifizieren, wurden SELEX-Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte ein einfaches Motiv das Palindrom GTT₃AAC bestimmt werden. Dieses Motiv wurde in eine Genomanalyse eingesetzt, bei der alle Promotorregionen nach diesem Motiv durchsucht wurden. Dabei wurden hauptsächlich Gene identifiziert, die während der ersten Schwefelantwort von *Pyrococcus furiosus* reguliert werden. Außerdem wurde bei der Analyse ein erweitertes Bindemotiv für SurR entdeckt: GTT₃AAC₅GTT.

EMSA und DNaseI-Footprint-Analysen ergaben, dass SurR spezifisch an den Promotor seines eigenen Gens und verschiedener anderer Gene, welche während der primären Schwefelantwort reguliert werden, bindet. Dabei handelt es sich beispielsweise um die Gene der Proteindisulfid-Oxidoreduktase (*pdo*, PF0094) und der NADPH-Schwefelreduktase (*nsr*, PF1186), die verstärkt exprimiert werden. Des Weiteren zu nennen sind die Gene der beta-Untereinheit der Hydrogenase I (*hydBI*, PF0891) und der membrangebundenen Hydrogenase I (*mbhI*, PF1423), deren Expression 10 min nach der Zugabe von Schwefel gehemmt wird (Lipscomb et al., 2009).

Weitere Untersuchungen befassten sich mit der Struktur von SurR. Hierzu wurde das mit Selenomethionin markierte Protein kristallisiert und einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen (Lipscomb, 2007). Es konnte festgestellt werden, dass SurR in der Kristallstruktur als Dimer vorliegt (Abb. 3). Weitere Untersuchungen ergaben, dass sich jedes Monomer in drei Bereiche aufteilen lässt. Es besitzt eine N-terminale und eine C-terminale winged Helix und gehört somit zu den (wHTH)-DNA-Bindeproteinen. Zwischen den beiden winged Helices befindet sich ein viersträngiges β -Faltblatt, ein kurzes zweisträngiges β -Faltblatt und zwei lange α -Helices, die zusammen eine Coiled-Coil-Struktur bilden (Abb. 3).

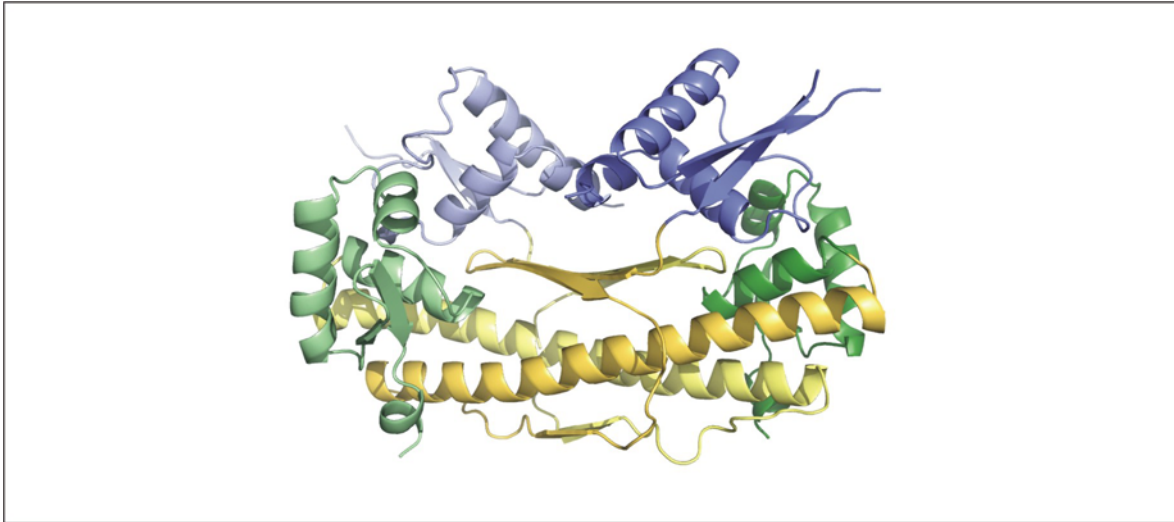


Abb. 3: Dimerstruktur des Transkriptionsregulators SurR

Die Abbildung zeigt die Struktur von SurR als Dimer. Die N-terminalen wHTH-Domänen sind blau, die mittleren Domänen (Coiled-Coil) gelb und die C-terminalen wHTH-Domänen grün abgebildet. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Gina Lipscomb und Hua Yang (University of Georgia, Athens) zur Verfügung gestellt.

Das N-terminale wHTH-Motiv von SurR besteht aus drei α -Helices. Die ersten beiden Helices sind über eine Random Coil-Struktur mit der dritten Helix verbunden. Danach folgt ein β -Faltblatt, welches den β -Hairpinwing bildet (Abb. 4).

Um die Erkennungshelix zu identifizieren, wurde die N-terminale Domäne von SurR mit wHTH-Motiven anderer Proteine verglichen, welche eine starke Übereinstimmung in der Sequenz aufwiesen. Bei dem Alignment konnte ein großer Unterschied zwischen dem HTH-Motiv von SurR und den anderen HTH-Motiven festgestellt werden. Im Gegensatz zu den HTH-Domänen der anderen Proteine befindet sich bei SurR keine Helix vor der Erkennungshelix sondern eine Random Coil-Struktur. Auf der N-terminalen Seite dieses Random Coil-Motivs befinden sich zwei nah aneinander liegende Cysteine, deren SH-Gruppen in der Kristallstruktur eine Disulfidbindung ausbilden. Dieser Befund führte zu der Annahme, dass dieses CxxC-Motiv in der HTH-Region die Konformation der DNA-Bindedomäne bestimmt und so die Bindeaktivität von SurR beeinflusst (Lipscomb, 2007). Für weitere Untersuchungen wurde eine SurR Mutante hergestellt. Dabei wurden die beiden Cysteine an Position 23 und 26 durch Alanin ersetzt. Aus dem CxxC-Motiv wurde somit ein AxxA-Motiv, weshalb die Mutante als AxxA-SurR beschrieben wird. AxxA-SurR kann keine Disulfidbrücken ausbilden und befindet sich somit immer im „reduzierten“ Zustand. Wobei „reduziert“ in diesem Fall die Struktur der Mutante beschreibt (Lipscomb, 2007).

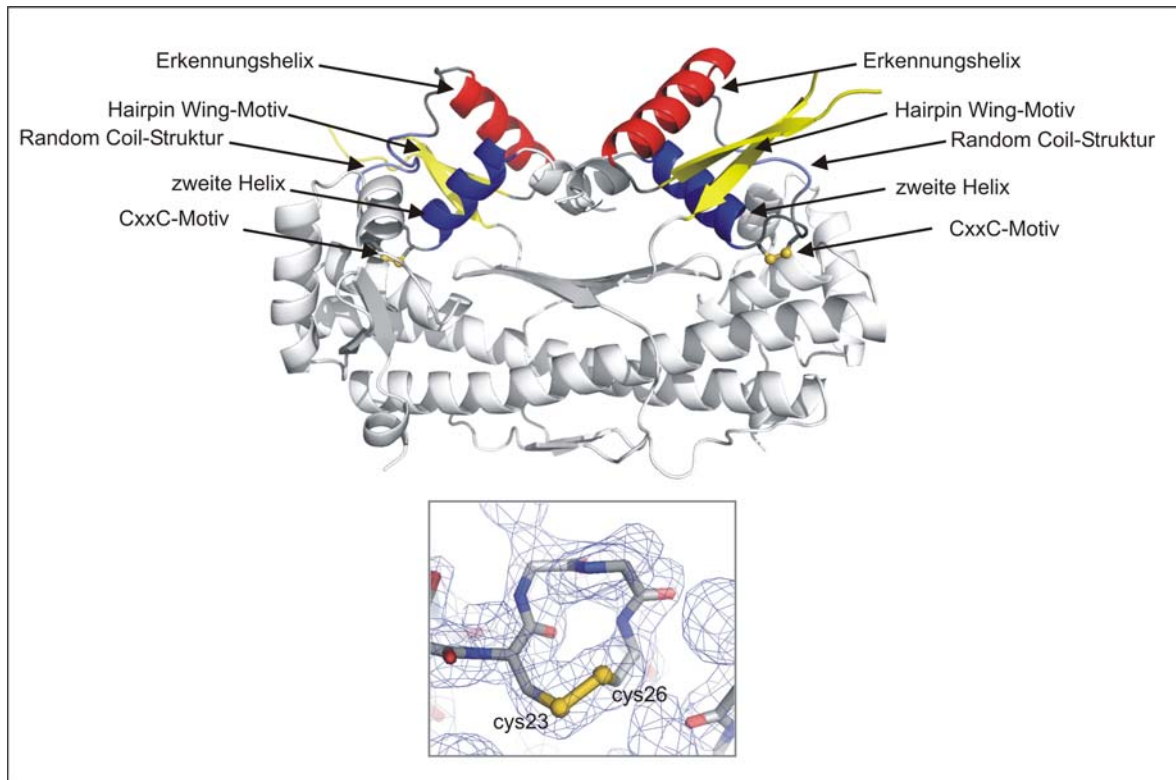


Abb. 4: SurR besitzt ein CxxC-Motiv in der N-terminalen Region

Die Abbildung zeigt die Struktur von SurR als Dimer. Die N-terminalen WHTH-Domänen sind farbig gekennzeichnet. Die zweite Helix und die Random Coil-Struktur sind blau, die Erkennungshelix rot und das Hairpin Wing-Motiv gelb dargestellt. Das CxxC-Motiv ist gold markiert. Die Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen ist in der unteren Abbildung vergrößert dargestellt. Das Strukturmodell wurde freundlicherweise von Gina Lipscomb und Hua Yang (University of Georgia, Athens) zur Verfügung gestellt.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass aerob gereinigtes SurR zu 80% im reduzierten Zustand vorliegt. Da bei der Strukturanalyse die oxidierte Form mit Disulfidbrücken vorlag, haben wahrscheinlich die Kristallisationsbedingungen die oxidierte Form begünstigt (Lipscomb, 2007).

EMSA-Experimente zeigten, dass SurR nur im reduzierten Zustand spezifisch an die Promotorregion *pdo-surR* bindet. Dabei wurden SurR und AxxA-SurR unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen untersucht. Als Reduktionsmittel wurde DTT und als Oxidationsmittel Diamid eingesetzt. Dieses Reagenz bewirkt ausschließlich die Oxidation der Thiole. Die Bindeaktivität von SurR konnte nur unter reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. In dem Kontrollansatz bindet AxxA-SurR unter beiden Bedingungen, da die Mutante keine Disulfidbrücken ausbildet und so ihren Konformationszustand nicht ändern kann (Lipscomb, 2007).

Nachdem durch *in vitro* Experimente nachgewiesen war, dass der Redoxzustand des CxxC-Motivs für die Bindeaktivität von SurR verantwortlich ist, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Effekt um einen Mechanismus handelt, der die Aktivität von SurR auch *in vivo* beeinflusst. Da bereits Studien vorlagen, die SurR in Verbindung mit der Regulation des Schwefelstoffwechsels brachten, wurde untersucht, ob Schwefelverbindungen als Oxidationsmittel dienen könnten.

Da elementarer Schwefel nicht wasserlöslich ist, wurde eine anaerobe Polysulfidlösung in die EMSA Experimente eingesetzt, so dass kolloidaler Schwefel vorlag. Dabei konnte wie erwartet keine Bindeaktivität von SurR mehr nachgewiesen werden. Der kolloidale Schwefel bewirkte die Oxidation des CxxC-Motivs. Auf der Basis dieses Experiments

wurden Footprint-Experimente durchgeführt, bei denen bewiesen werden konnte, dass die sequenzspezifische Bindung von SurR in Gegenwart von kolloidalem Schwefel nicht mehr erfolgt (Lipscomb, 2007).

Durch weitere Footprintexperimente konnte nachgewiesen werden, dass die Oxidation von SurR mit kolloidalem Schwefel durch DTT reversibel ist. Bei dem CxxC-Motiv handelt es sich um einen Redoxschalter, der die Aktivität von SurR *in vitro* beeinflusst.

Außerdem wurde gezeigt, dass die Oxidation der Cysteine im CxxC-Motiv eine Konformationsänderung der wHTH Domäne hervorruft, die bewirkt, dass SurR nicht mehr spezifisch an DNA binden kann.

Um die reduzierte und die oxidierte Struktur von SurR miteinander zu vergleichen, wurde AxxA-SurR ebenfalls kristallisiert (Abb. 5). Da die Mutante die DNA wie reduziertes SurR bindet, wurde angenommen, dass AxxA-SurR die gleiche Struktur besitzt wie reduziertes SurR.

Der Vergleich der beiden Kristallstrukturen ergab, dass die oxidierte und die reduzierte Form von SurR fast identisch sind, außer einiger Unterschiede in der Kette A der HTH-Region. Somit scheint die Positionsänderung einiger Aminosäureseitenketten eine wichtige Rolle bei der Erkennung und der Bindung der DNA zu haben (Lipscomb, 2007).

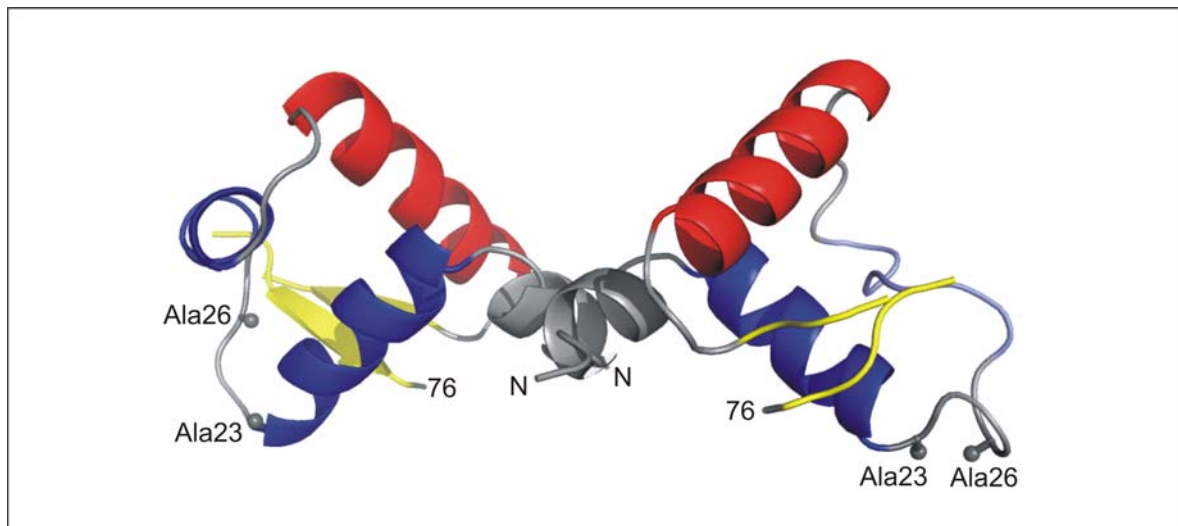


Abb. 5: Dimerstruktur der N-terminalen Region von AxxA-SurR

Die Abbildung zeigt die Struktur von AxxA-SurR als Dimer, dabei ist die N-terminale Region mit den Aminosäuren 1-76 dargestellt. Die erste Helix ist grau, die zweite Helix blau, die Random Coil-Struktur hellblau, die Erkennungshelix rot und das Hairpin Wing-Motiv gelb dargestellt. Die AxxA-Aminosäuren sind als Kugeln gezeigt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Gina Lipscomb und Hua Yang (University of Georgia, Athens) zur Verfügung gestellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der neue Transkriptionsregulator SurR durch *in vitro* Transkriptionsanalysen und Primer Extension-Experimente genauer untersucht. Diese Studien sollten die Funktion von SurR als Transkriptionsregulator bestätigen. Außerdem wurden Untersuchungen zur Regulation des Bindeverhaltens von SurR durchgeführt.

II Material

1. Bezugsquellen von Proteinen und Chemikalien

1.1 Chemikalien

Agarose	Roth, Karlsruhe
APS	Serva, Heidelberg
BlueSlick	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC	Sigma, St. Louis (USA)
DNA-Marker	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
dNTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma, St. Louis (USA)
Glycerin (87%)	Sigma, St. Louis (USA)
Glycogen	Roche, Mannheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma, St. Louis (USA)
Isotope ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$; $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$)	Hartmann Analytic, Braunschweig
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
NTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitors Cocktail	Roche, Mannheim
RNAguard	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
Rotiphorese Gel 30&40	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	ESB, Cleveland (USA)
Whatman-Papier	3MM, Maidstone (UK)
Xylenecyanol	Serva, Heidelberg

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war in der Regel p. A.. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt oder Sigma, St. Louis (USA) bezogen.

1.2 Enzyme und andere Proteine

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison (USA)
BSA	Roche, Mannheim
Phusion-Taq-DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo (Finnland)
Proteinase K	MBI, Fermentas, Vilnius (Litauen)
Restriktionsenzym <i>Sma</i> I	New England Biolabs, Ipswich (USA)
RNase A	Ambion, Foster City (USA)
T4-Polynukleotid Kinase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Turbo DNase, RNase frei	Ambion, Foster City (USA)

Transkriptionsfaktoren:

Die rekombinanten Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Pyrococcus furiosus* lagen bereits gereinigt im Labor vor.

Transkriptionsregulatoren:

Phr mit C-terminalem His-Tag wurde freundlicherweise von Dr. Gudrun Vierke zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes SurR wurde freundlicherweise von Dr. Gina Lipscomb zur Verfügung gestellt.

1.3 Kits

QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Genomic-tips	Qiagen, Hilden
Genomic DNA buffer Set	Qiagen, Hilden

2. Archaeenstamm

<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638	Fiala and Stetter, 1986
------------------------------------	-------------------------

3. Plasmide

pUC19/ <i>gdh</i>	Hethke et al., 1996
pUC18/ <i>mbh</i>	Lipscomb et al., 2009
pUC18/ <i>hydB1</i>	Lipscomb et al., 2009
pUC18/ <i>nsr</i>	Lipscomb et al., 2009
pUC18/ <i>surR</i> + <i>pdo</i>	Lipscomb et al., 2009

4. Oligonukleotide

Oligonukleotide für Primer Extension-Experimente:

0094p:	5'-CCTTAATTACCTTCTTGTCAGC-3'
0095a:	5'-GCATTCCATACAAGTTAGG-3'
PF0891p:	5'-GGTAACTTAACATACCTCACAC-3'
PF1186p:	5'-CTCTAGAAGCGGCACTCATTAC-3'
PF1423p:	5'-GCTATGAGTTCCTGGGTACTC-3'
aaa135:	5'-CCTAGCTCTCTCATCGTTTCC-3'
gdh108:	5'-GCTTCTTCACTTATCTCC-3'
hsp20 130:	5'-GCTGAAGAATTCATCGAACATTGC-3'
phr97:	5'-GCAGGAATAGTATTCTTCTCC-3'

Oligonukleotide zur Amplifikation von Promotor-DNA-Matrizen:

PF0624for:	5'-CACGAGAGCTGTTATTTTGG-3'
PF0624rev:	5'-GATCTGCAAGCTTCCTCTC-3'
PF1042for:	5'-CCAAGTATTGGGTCAATCTCCC-3'
PF1042rev:	5'-CGTAGGCCCTTTCTATGG-3'
PF1291for:	5'-GATAAGGATAATATAGAGG-3'
PF1291rev:	5'-CTTCTCAATCTCGTACC-3'
PF1292for:	5'-CTGAAGTTTTCCTCC-3'
PF1292rev:	5'-GAGTTAGTATATCCAAGG-3'
PF1488for:	5'-CCATATCGAACTATAATAGAG-3'
PF1488rev:	5'-GTCTTTCATTCTAAACC-3'
PF1616for:	5'-CAAATATTGTGCGGCGA-3'
PF1616rev:	5'-GTCCACATCATAGGAAGC-3'
PF1790for:	5'-GGTGGATCTAATCAAAAGATCAC-3'
PF1790rev:	5'-CCTACTCCTAATTCTCTACTTAGC-3'
PF1882for:	5'-CAAAATCCTTGGATCATAACC-3'
PF1882rev:	5'-CTACCAACATCTCTCTGATAAGC-3'
PF1883for:	5'-GGAGTATTTTGTATTGTTTCG-3'
PF1883rev:	5'-CTCTCTCCAGACTTCTCC-3'
M13 uni (-21):	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'
M13 rev (-29):	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
pdo-surR:	5'-GCCACAGCAGTTGATGAC-3'
surR:	5'-CTAGGTTGTCAACCTTAGGTTG-3'
pdo:	5'-CTGTGGCGCAAAGTTTATATATTG-3'

Oligonukleotide für EMSA:

MIPS:	5'-CACCAATTTTAGCAAAACAGGAGGTGAGGACTGATG-3'
MIPSrev:	5'-CATCAGTCCTCACCTCCTGTTTTGCTAAAATTGGTG-3'
MIPSII:	5'-GACTTTTGTCTATAAAAGTTAATAAAAAGAAATTCA-3'
MIPSIIrev:	5'-TGAATTTCTTTTTATTAACTTTTATAGACAAAAGTC-3'
MIPSI:	5'-GAAATTTTATAAACCAAGTTACTTAAAAGTAGAT-3'
MIPSIrev:	5'-ATCTACTTTTAAAGTAACTTTGGTTTATAAAAATTTC-3'
Kontrolle:	5'-TCGAAGTTTGTAGTAACCATTTGGTAATCAAAATATTG-3'
Kontrollerev:	5'-CAATATTTTGTATTACCAATGGTTACTAAAACCTTCGA-3'

III Methoden

1. Reinigung der RNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*

Pyrococcus furiosus wurde in einem 100 l Fermenter in synthetischem Meerwassermedium unter anaeroben Bedingungen bei 95°C kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen bei einer Temperatur von -80°C gelagert. Die Aufreinigung der RNAP wurde bei 4°C durchgeführt. Zu Beginn wurden 100 g Zellen in 200 ml Lösungspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mittels Ultraturrax T-25 (Janke & Kunkle) homogenisiert und die Zellen mechanisch mit der French Press (2 x 1200 psi, French Pressure Cell, American Instruments Company, USA) aufgeschlossen. Vor der Säulenaufreinigung erfolgte eine Ultrazentrifugation des Zelllysats (100.000 x g, 90 min bei 4°C; OptimaTMLE-80K, Beckmann, USA). Der Überstand wurde gegen Biorex+100 Puffer dialysiert und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte und mit BioRex[®]70 (Bio-Rad, USA) gepackte FPLC XK50/30-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0-100% mit Biorex+1000 Puffer über drei Säulenvolumen. Fraktionen, welche in Promotor unabhängigen *in vitro* Transkriptionsansätzen RNAP-Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und gegen TMK+100 Puffer dialysiert. Danach wurde die Probe auf eine mit TMK+100 äquilibrierte 20 ml Heparin-Sepharose Säule (HiPrep 16/10 Heparin FF) geladen. Die Elution der Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten von 0-100% TMK+800 Puffer und 15 Säulenvolumen. Die Fraktionen wurden auf einem 8-20% SDS-Polyacrylamidgel analysiert und ihre Aktivität im *in vitro* System nachgewiesen. Danach erfolgte eine Dialyse gegen TMK+100 Puffer. Das Eluat wurde auf eine äquilibrierte 10 ml 15Q Säule aufgetragen. Die RNAP wurde über 20 Säulenvolumen mit einem linearen Gradienten von 0-60% TMK+800 Puffer eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden auf einem 8-20% SDS-PA-Gradientengel analysiert. Fraktionen, welche RNAP enthielten, wurden auf eine Salzkonzentration von 100 mM KCl eingestellt und auf eine äquilibrierte 1 ml Mono Q 5/50 GL Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte über 25 Säulenvolumen mit einem linearen Gradienten von TMK+100 Puffer bis 50% TMK+800 Puffer.

Die Reinheit der RNAP wurde auf einem 8-20% SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch den Bradfordtest gegen BSA (Bradford, 1976).

Aliquots der RNAP wurden bei 80°C gelagert. Alle aufgeführten Säulen stammten, wenn nicht anders angegeben, von Amersham Biosciences, UK.

Die Aufreinigung wurde mit dem System AEKTA purifier 12 von GE Healthcare, Uppsala, Schweden durchgeführt.

Lösungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor

Biorex+100 Puffer: 40 mM K-HEPES (pH 7.8), 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor

Biorex+1000 Puffer: 40 mM K-HEPES (pH 7.8), 1 M KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor

TMK+0 Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.3), 2.5 mM MgCl ₂ , 10% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor
TMK+100 Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.3), 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 10% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor
TMK+800 Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 10% v/v Glycerin, 1 mM PMSF, 5 mM Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor

2. Erstellung von Matrizen für die *in vitro* Transkription mittels PCR

In die *in vitro* Transkriptionen wurde PCR-amplifizierte DNA, welche die Promotorregion der zu untersuchenden Gene enthielt, eingesetzt. Die PCR wurde mit der Phusion Polymerase nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde genomische DNA als Matrice eingesetzt. Für die Amplifikation des *gdh*-Promotors wurde das Plasmid pUC19/*gdh* verwendet. Für die Untersuchungen von SurR wurden Plasmide, welche die zu untersuchende Promotorregion enthielten, von Gina Lipscomb zur Verfügung gestellt. Diese Regionen wurden mit M13-Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel analysiert.

3. Präparation genomischer DNA aus *Pyrococcus furiosus* für die *in vitro* Transkription

Die Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte mit dem Qiagen Genomic Kit, dessen Protokoll modifiziert wurde. *Pyrococcus furiosus* wurde wie in Abschnitt 1 beschrieben kultiviert und bei -80°C gelagert. Für die Präparation wurden 0.25 g Zellen aufgetaut und mit 10 µl RNase A (100 mg/ml) und 60 U Proteinase K für 1 Stunde bei 37°C in 3.5 ml Puffer B1 inkubiert. Nach Zugabe von 1.2 ml Puffer B2 wurde die Suspension zwei Stunden bei 50°C inkubiert. Mit der klaren Lösung wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Bevor die DNA in die genomische *in vitro* Transkription eingesetzt wurde, erfolgte ein Restriktionsverdau mit *Sma*I nach dem Protokoll des Herstellers. Die Restriktion wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Danach wurde die DNA über Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt und in Ethanol gefällt. Die Konzentration wurde mit einem Spectrophotometer (NanoDrop, ND-1000) bestimmt.

4. *In vitro* Transkription spezifischer Gene

In vitro Transkriptionsexperimente wurden im zellfreien Transkriptionssystem von *Pyrococcus furiosus* nach Hethke et al., 1996 durchgeführt. Dabei wurde aufgereinigte, DNA-abhängige, endogene RNA-Polymerase und rekombinante Transkriptionsfaktoren TFB und TBP aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt. Als Matrice diente PCR-amplifizierte DNA, welche die zu untersuchende Promotorregion der Gene enthielt. Die Konzentration ist jeweils angegeben und betrug 7-25 nM. Des Weiteren bestand ein Transkriptionsansatz

aus 19 nM RNAP, 104 nM TBP, 23 nM TFB, jeweils 0.44 mM ATP, GTP, CTP, 0.002 mM UTP und 2 μ Ci [α - 32 P]-UTP. Wenn angegeben enthielten die Ansätze zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem Phr oder SurR. Die Reaktionen erfolgten in Transkriptionspuffer und in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Dabei wurde der Transkriptionspuffer für die Experimente mit Phr leicht modifiziert, um ihn an das genomische *in vitro* System anzupassen. Die Inkubation erfolgte bei 70°C für 30 min in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf). Anschließend wurden die RNA-Produkte durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Die Ansätze wurden mit Auftragspuffer versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert. Die Transkripte wurden in 8%igen Polyacrylamid-Harnstoffgelen aufgetrennt. Danach erfolgte die Analyse und Quantifizierung durch einen Phosphorimager (FLA-5000, Fuji, Japan).

Transkriptionspuffer Phr:	40 mM Na-HEPES (pH 7.3), 6 mM MgCl ₂ , 0.1 mM EDTA, 300 mM NaCl
Transkriptionspuffer SurR:	40 mM K-HEPES (pH 7.3), 2.5 mM MgCl ₂ , 0.1 mM EDTA, 280 mM KCl
Auftragspuffer:	98% Formamid, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol, 10 mM EDTA (pH 8.0)

5. *In vitro* Transkription chromosomaler DNA von *Pyrococcus furiosus*

Für das ROMA-Experiment wurde mit *Sma*I behandelte chromosomale DNA als Matrize eingesetzt. Die *in vitro* transkribierte RNA wurde mit DNaseI behandelt und filtriert. Die einzelnen Schritte werden in diesem Abschnitt genauer erklärt.

5.1 Die genomische *in vitro* Transkription

Für eine *in vitro* Transkription aller Gene von *Pyrococcus furiosus* wurden 4 μ g genomische DNA, welche wie in Abschnitt 3 erklärt behandelt wurde, als Matrize eingesetzt. Des Weiteren enthielten die Ansätze 120 nM rekombinantes TFB und 120 nM rekombinantes TBP, sowie 5 μ g aufgereinigte, DNA-abhängige, endogene RNA-Polymerase.

Es wurde eine basale Transkription ohne Phr und eine mit 2700 nM rekombinantem Phr durchgeführt. Die Konzentration der Nukleotide betrug 1 mM ATP, 1 mM GTP, 0.4 mM CTP und 0.1 mM UTP. Die Reaktionen erfolgten in Transkriptionspuffer bei 70°C für 30 min in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf). Das Gesamtvolumen eines Transkriptionsansatzes betrug 100 μ l. Die Transkription wurde durch die Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1) gestoppt. Danach erfolgte eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und anschließend wurde die RNA mit Ethanol gefällt.

Transkriptionspuffer:	40 mM Na-HEPES (pH 7.3), 300 mM NaCl, 6 mM MgCl ₂ , 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 0.01 mg/ml BSA
------------------------------	---

5.2 Aufreinigung der RNA durch DNase-Verdau

Um die DNA-Matrize zu entfernen, wurden die Ansätze mit TURBO-DNase behandelt. Dafür wurde das präzipitierte Pellet in 80 µl RNase-freiem H₂O, 10 µl DNase Puffer, 2 µl RNAGuard (Amersham Biosciences, UK) und 10 µl TURBO DNase 90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die RNA durch zweimalige PCI- und anschließender CI-Extraktion gereinigt und in Ethanol gefällt.

5.3 Filtration der RNA

Um die RNA von den Nukleotiden aus dem DNase-Verdau zu reinigen, wurde sie filtriert (Microcon, YM-30, Millipore, USA). Dafür wurde das Pellet in 100 µl RNase freiem H₂O aufgenommen und drei Mal mit 300 µl RNase freiem Wasser gewaschen und bis zu einem Endvolumen von 40 µl filtriert.

Danach erfolgte die Konzentrationsbestimmung über ein Spectrophotometer (NanoDrop, ND-1000). Die Konzentration lag bei 150 ng/µl. Die RNA wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

6. Markierung der Oligonukleotide für Primer Extension-Experimente

Die Oligonukleotide, welche in den Primer Extension-Experimenten eingesetzt wurden, mussten vorher radioaktiv markiert werden. Hierfür wurden die dehydrierten Oligonukleotide in H₂O gelöst, so dass sie in einer Endkonzentration von 10 µM vorlagen. 10 pmol Oligonukleotide wurden mit 10 U PNK und 20 µCi [γ -³²P]-ATP in PNK-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die freien Nukleotide mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit entfernt. Die Oligonukleotide wurden in 20 µl TE resuspendiert, so dass sie in einer Konzentration von 500 nM vorlagen. In die Primer Extension-Experimente wurden sie in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt.

7. Primer Extension

Um die Transkriptionsstartpunkte der von SurR regulierten Gene *in vitro* zu bestimmen, wurden Primer Extension-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchende RNA ohne Zugabe von Radioaktivität synthetisiert. Die Konzentration jedes Nukleotids in dieser *in vitro* Transkription betrug 0.44 mM. Hiernach wurde die DNA durch einen Turbo-DNase-Verdau entfernt. Die verbliebene RNA wurde durch eine PCI-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 10 µl H₂O aufgenommen. 3 µl dieser RNA wurden mit 1 µl AB-Puffer und 1 µl radioaktiv endmarkiertem Oligonukleotid versetzt. Der Ansatz wurde im Thermocycler 3 min auf 80°C erhitzt und danach auf 35°C abgekühlt. Hiernach wurden 1.7 µl dNTP-Mix P und 1.7 µl RT- Mix zugegeben und der Ansatz 30 min bei 50°C inkubiert. Es wurden 4 µl Auftragspuffer zugegeben und die Reaktionen bei 85°C für 3 min denaturiert. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem Sequenzstandart auf ein 8%iges Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetragen und mit einem Phosphorimager analysiert.

Die Primer Extension-Experimente dienten außerdem zur Analyse der *in vitro* synthetisierten genomischen RNA. Durch sie konnte die Menge der RNA eines

bestimmten Gens aus dem RNA-Pool untersucht werden. Die Experimente dienten der Optimierung der genomischen *in vitro* Transkription. Außerdem waren sie eine wichtige Kontrolle für die Regulation durch den Transkriptionsregulator, bevor die Microarray-Analyse durchgeführt wurde.

AB-Puffer:	250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 300 mM NaCl
RT-Mix:	50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 60 mM NaCl, 30 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 U AMV Reverse Transkriptase
dNTP-Mix P:	2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 60 mM NaCl

8. Markierung der RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen

Vor der Hybridisierung mit einem Microarray wurde die genomische *in vitro* transkribierte RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dazu wurden ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kits (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Die Markierung erfolgte mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor 647 und Alexa Fluor 594. Jede Transkriptionsbedingung wurde mit einem anderen Farbstoff markiert. Zuerst wurden 10 µl RNA (150 ng/µl) mit 11 µl Markierungs-Puffer und 4 µl Markierungs-Reagenz versetzt. Die Ansätze wurden 5 min bei 90°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Danach folgte eine Aufreinigung über Micro Bio-SpinP-30 Säulen (Bio-Rad, USA), um freien Farbstoff abzutrennen. Hierbei wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die gereinigte RNA wurde unter Vakuum getrocknet und sofort einer Microarray-Analyse unterzogen.

9. Microarray-Analyse (Schut et al., 2003)

Für die Hybridisierung an den DNA-Microarray wurde die basale und die regulierte RNA in je 13 µl H₂O, 13 µl Hybridisierungspuffer (Amersham Biosciences, UK) und 26 µl Formamid gelöst. Hiernach wurden die Ansätze gemischt und 2 min bei 70°C inkubiert. Von der Hybridisierungslösung wurden 52 µl auf den Microarray aufgetragen und mit einem Deckgläschen überschichtet. Um Austrocknung zu vermeiden wurde der Microarray in eine Inkubationskammer gelegt.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C.

Am nächsten Tag wurde der Microarray nach folgendem Waschprotokoll behandelt:

Puffer	Zeit
2 x SSC, 0.1% SDS	5 min
2 x SSC, 0.1% SDS	5 min
0.2 x SSC, 0.1% SDS	5 min
0.2 x SSC	5 min
H ₂ O	5 min

Tab. 2: Waschprotokoll für Microarrays

Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde der Microarray nach diesem Waschprotokoll behandelt.

Danach wurde der Microarray kurz trocken zentrifugiert und mit dem Scan Array 5000 slide reader (Perkin-Elmer) gescannt. Zur Auswertung diente das Programm Gleams software package (Nutec, Houston, USA).

Auf dem DNA-Microarray waren alle 2192 ORFs von *Pyrococcus furiosus* drei Mal vertreten (Schut et al., 2007).

10. Eletrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Um die Bindung von Phr an den Promoter des Gens PF1616 nachzuweisen, wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Dabei wurden drei unterschiedliche Sequenzbereiche dieses Promotors analysiert. Zuerst wurden Oligonukleotide, welche die zu untersuchende Region enthielten, miteinander hybridisiert, um doppelsträngige DNA zu erhalten. Für diese Reaktion wurden die Oligonukleotide 3 min bei 94°C in einem Wasserbad inkubiert und über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

Für die Bindereaktion von Phr an den Promotor wurden 2.1 µM DNA mit 10 µM Phr inkubiert. In dem 10 µl-Versuchsansatz lagen außerdem 40 mM Na-HEPES (pH 7.3), 325 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 5% Polyethylenglycol (PEG) 8000, 3 µg BSA und 1 µg Poly(d(I-C)) vor. Die Bindereaktion von Phr an die DNA erfolgte für 10 min bei 70°C im Thermocycler. Danach wurden die Ansätze auf 25°C abgekühlt und auf ein nicht denaturierendes 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel 30 min in einem TBE-Ethidiumbromidbad geschwenkt. Zur Auswertung der Experimente diente ein Phosphoimager (FLA-5000, Fuji).

IV Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in zwei Abschnitte gegliedert.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Erstellung eines ROMA-Systems und der damit verbundenen Analyse des Transkriptionsregulators Phr.

Der zweite Abschnitt beinhaltet Untersuchungen über den neuen Transkriptionsregulator SurR, welcher durch *in vitro* Transkriptionsanalysen und Primer Extension-Experimente genauer charakterisiert wurde.

1. Untersuchungen des Hitzeschockregulators Phr durch ROMA

Um das gesamte Spektrum an regulierten Genen eines Transkriptionsregulators zu bestimmen, sollte ein ROMA-System für *Pyrococcus furiosus* erstellt werden.

Als zu untersuchender Transkriptionsregulator wurde Phr gewählt. Durch die Bestimmung seines Regulons sollte seine Rolle bei der Hitzeschockantwort genauer definiert werden, und außerdem sollte die Identifizierung seiner Zielgene weitere Informationen über die Hitzeschockantwort bei hyperthermophilen Archaeen liefern.

1.1 Etablierung des genomischen *in vitro* Transkriptionssystems

Um ein *in vitro* Transkriptionssystem für chromosomale DNA von *Pyrococcus furiosus* zu entwickeln, wurde das Standard-System von (Hethke et al., 1996) in Bezug auf Protein-, DNA- und Salzkonzentration optimiert.

Die unterschiedlichen *in vitro* Transkriptionen wurden durch Primer Extension-Experimente analysiert, um die günstigste Bedingung für ein ROMA-Experiment zu ermitteln. Als Beispiel für diese Versuche ist in Abbildung 6 die Untersuchung zur Bestimmung der optimalen Konzentration von Phr dargestellt.

Dabei wurden unterschiedliche Phr-Konzentrationen in genomische *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Danach wurde die *in vitro* transkribierte RNA durch Primer Extension-Experimente analysiert. Dabei wurde die RNA des *hsp20* Gens nachgewiesen, welches von Phr reguliert wird. In Spur 1 ist die Analyse der Transkription ohne Phr aufgetragen. Die hier nachgewiesene RNA-Menge entspricht 100%. Die restlichen Spuren zeigen die Untersuchungen von Transkriptionen mit steigender Menge an Phr. Schon bei einer Konzentration von 0.1 μM Phr nimmt die Expression von *hsp20* um die Hälfte ab. Bei einer Konzentration von 2.1 μM ist die stärkste Hemmung durch Phr erreicht. Obwohl sich die Signale bei einer Konzentration von 2.1 μM und 2.7 μM Phr kaum unterscheiden, wurde die *in vitro* Transkription für das ROMA-Experiment mit der höheren Konzentration durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, dass auch Gene, welche eine schwächere Bindestelle für Phr haben und weniger stark reguliert werden als *hsp20*, im ROMA-Experiment erfasst werden.

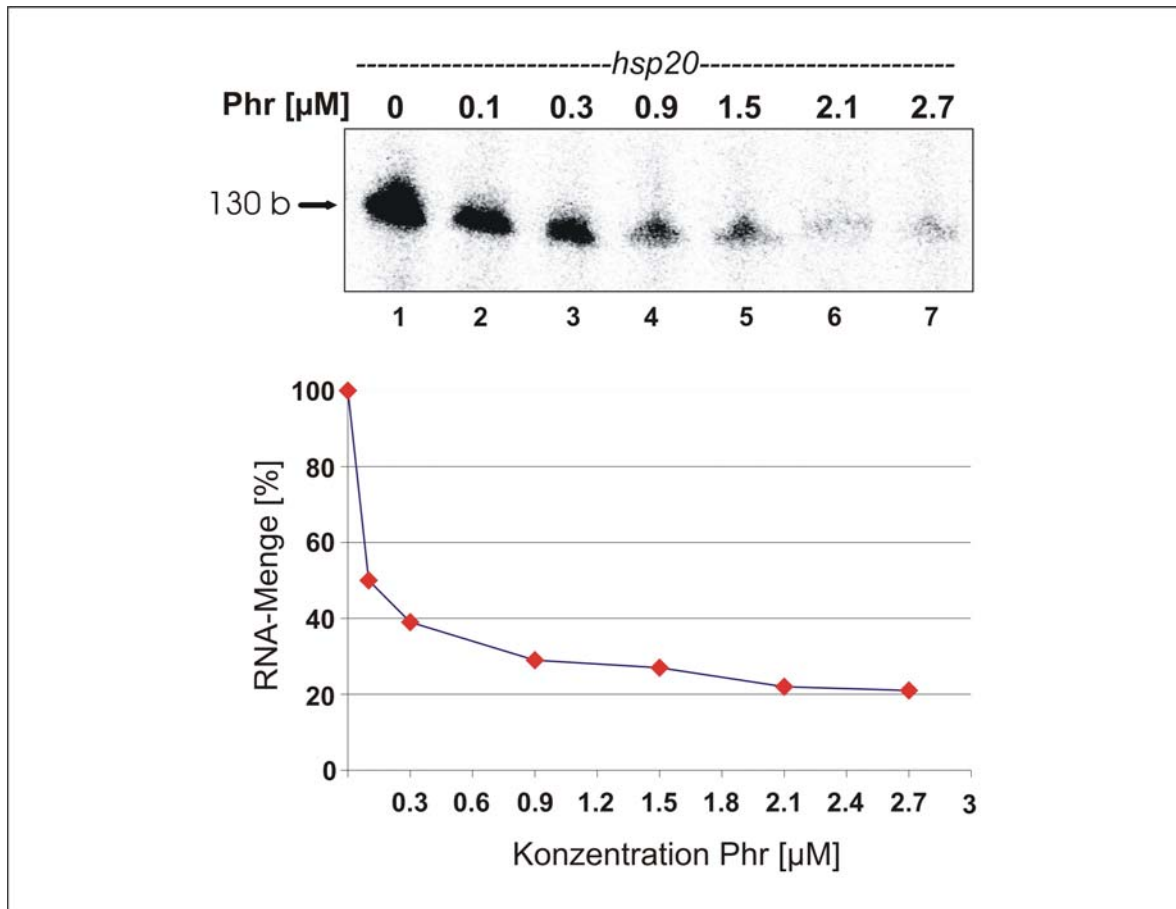


Abb. 6: Bestimmung der optimalen Konzentration von Phr für die genomische *in vitro* Transkription

Es wurden steigende Konzentrationen von Phr in genomische *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Die dabei synthetisierte RNA wurde durch Primer Extension-Experimente analysiert, in welche radioaktiv markierte Oligonukleotide eingesetzt wurden. Mit diesen konnte die RNA des von Phr regulierten Gens *hsp20* nachgewiesen werden. Die Primer Extension-Produkte wurden auf 8%igen PA-Harnstoffgelen analysiert und mit einem Phosphorimager quantifiziert. Dabei entspricht die nachgewiesene RNA von *hsp20* in der Abwesenheit von Phr 100%.

Außerdem wurde untersucht, welches Restriktionsenzym sich optimal für die Fragmentierung der DNA-Matrize eignet. Primer Extension-Experimente ergaben, dass chromosomale DNA, welche mit *Sma*I geschnitten wurde, zu den spezifischsten Transkriptionsprodukten führt. Dieses Enzym schneidet an gegenüberliegenden Stellen und erzeugt dadurch Blunt-end-Fragmente. Diese Fragmente führten im *in vitro* System zu weniger unspezifischen Produkten, welche durch so genannte „end to end“-Transkriptionen auftreten. Dies war besonders bei Fragmenten mit überstehenden Enden zu beobachten.

Die durchschnittliche Fragmentgröße der mit *Sma*I behandelten *Pyrococcus furiosus*-DNA beträgt 17 kb.

1.2 Analyse der genomischen *in vitro* Transkriptionen durch Primer Extension-Experimente

Vor jeder Microarray-Analyse wurde die *in vitro* transkribierte RNA durch Primer Extension-Experimente analysiert. Diese Kontrolle diente dem Nachweis von RNA und der Regulation der Transkription durch Phr. Hierfür wurden die RNAs von einer basalen und von einer mit Phr regulierten genomischen *in vitro* Transkription miteinander verglichen.

In die Primer Extension-Experimente wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide, mit welchen die Gene *phr*, *hsp20* und *aaa⁺atpase* nachgewiesen werden konnten, eingesetzt. Von diesen Genen war bereits bekannt, dass sie von Phr reguliert werden (Vierke et al., 2003), und somit dienten sie dem Nachweis für die Regulation durch Phr.

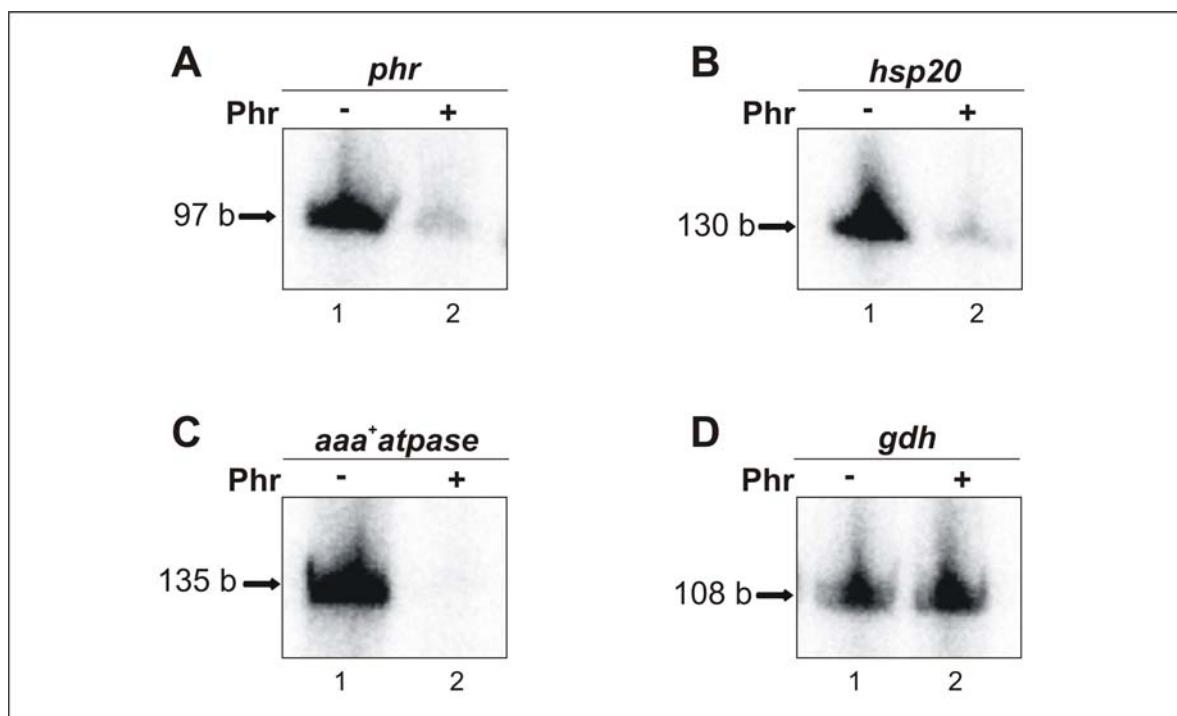


Abb. 7: Phr reguliert im genomischen *in vitro* System spezifisch die Transkription von Hitzeschockgenen

Primer Extension-Analyse der *in vitro* transkribierten RNA unterschiedlicher Gene, welche von Phr reguliert werden. Spur 1 zeigt jeweils die Analyse der basalen Transkription und Spur 2 die Analyse der Transkription mit 2.7 μ M Phr. (A) Analyse des *phr*-Transkripts, (B) Analyse des *hsp20*-Transkripts, (C) Analyse des *aaa⁺atpase*-Transkripts. (D) Die Analyse des *gdh*-Transkripts diente als Kontrolle. Dieses Gen wird wie erwartet nicht von Phr reguliert. Der Gellauf erfolgte in 8%igen PA-Harnstoffgelen.

Die Primer Extension-Experimente sind in Abbildung 7 dargestellt. Abbildung 7A zeigt die Analyse des Gens für Phr, Abbildung 7B die Analyse für *hsp20* und Abbildung 7C die Analyse für *aaa⁺atpase*. Die Spur 1 zeigt jeweils die Primer Extension-Untersuchung der RNA der basalen Transkription ohne Phr. Wie erwartet konnte bei diesem Experiment die RNA aller drei Gene nachgewiesen werden. Auf der zweiten Spur ist jeweils die Primer Extension-Analyse der RNA, die mit einer Konzentration von 2.7 μ M Phr transkribiert wurde, aufgetragen. Von allen drei Genen lag keine RNA mehr vor. Damit wurde belegt, dass Phr seine Rolle als Regulator in der genomischen *in vitro* Transkription erfüllt, indem er die Transkription der von ihm regulierten Gene hemmt.

Die Primer Extension-Analyse für das Gen der Glutamatdehydrogenase (*gdh*, PF1602) diente in diesem Experiment als Kontrolle, da es nicht von Phr reguliert wird. Die RNA

dieses Gens konnte bei der basalen und bei der Transkription mit Phr nachgewiesen werden (Abb. 7D). Somit wurde bewiesen, dass Phr in dem neu etablierten Transkriptionssystem nur die Transkription von Hitzeschockgenen spezifisch hemmt.

1.3 Das ROMA-Experiment

Um das Regulon von Phr zu bestimmen, sollte eine Transkription mit chromosomaler DNA mit und ohne den Regulator durchgeführt werden und im Anschluss die *in vitro* transkribierte RNA einer Microarray-Analyse unterzogen werden.

Hierfür wurde fragmentierte, genomische DNA als Matrize in das *in vitro* Transkriptionssystem eingesetzt. Dabei wurden parallel zwei Ansätze, einer mit und einer ohne Phr, erstellt. Die *in vitro* transkribierte RNA wurde durch eine DNaseI-Behandlung, einer Phenol-Chloroform-Extraktion und einer anschließenden Filtration, die zum Abtrennen freier Nukleotide diente, gereinigt. Die anschließende Microarray-Analyse wurde von Dr. Gerrit Schut im Labor von Mike Adams (University of Georgia, Athens) oder von mir unter seiner Anleitung in Athens durchgeführt. Dabei wurde die RNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um die Transkription mit und ohne Phr voneinander zu unterscheiden. Die beiden *in vitro* RNA-Ansätze wurden gemischt und mit einem Microarray hybridisiert. Auf diesem Microarray war das Genom von *Pyrococcus furiosus* drei Mal in Form von PCR-Produkten repräsentiert (Schut et al., 2003).

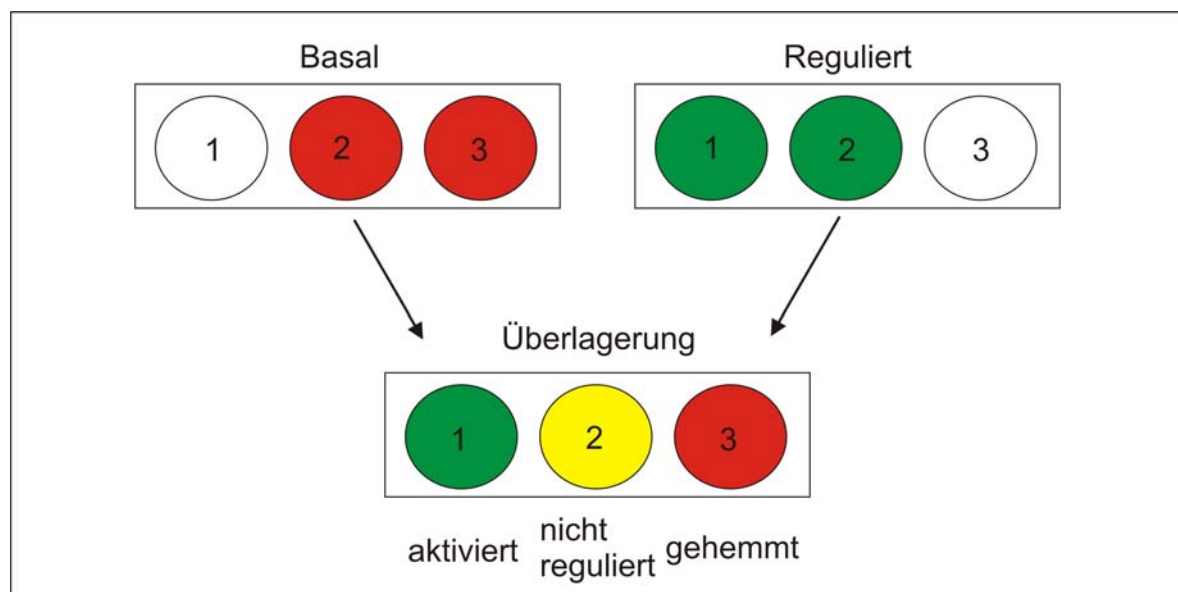


Abb. 8: Prinzip der Falschfarbendarstellung

Schematische Darstellung der Auswertung eines Microarray-Experiments. Zu vergleichende Proben werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit dem Microarray hybridisiert. Den unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen werden Falschfarben (Rot und Grün) zugeordnet. Die Überlagerung dieser „roten“ und „grünen“ Signale ermöglicht es, regulierte Gene zu identifizieren. Gleich intensive rote und grüne Signale ergeben ein gelbes Signal und repräsentieren Gene, die nicht reguliert werden (2). Signale, die mehr rot oder grün sind, deuten auf eine unterschiedliche Expression hin (1 und 3). Dabei bedeutet ein grünes Signal, dass das Gen aktiviert wurde und ein rotes das seine Expression gehemmt wurde.

Zur Auswertung wurde der Microarray eingescannt und dabei die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Die dabei erstellten Bilder wurden mit einem Bildbearbeitungsprogramm analysiert und ausgewertet. Um die regulierten Gene zu identifizieren, wurden die Fluoreszenzsignale miteinander verglichen. Für eine visuelle Auswertung diente die Falschfarbendarstellung, welche in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist. Dazu wurden den Fluoreszenzsignalen unterschiedliche Farben zugeordnet. Das Fluoreszenzsignal der ohne Phr transkribierten RNA bekam eine rote Farbe und das Fluoreszenzsignal der RNA mit Phr eine grüne Farbe. Durch die Überlagerung der roten und grünen Signale war es möglich die unterschiedlichen Transkriptionen miteinander zu vergleichen und regulierte Gene zu identifizieren. Gleich starke grüne und rote Signale ergaben ein gelbes Signal und repräsentieren Gene, die in beiden Transkriptionsansätzen gleich stark exprimiert wurden. Sie wurden also nicht von Phr reguliert. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *gdh*. Rote und grüne Signale deuten auf eine stärkere Expression in einem der beiden Transkriptionsansätze hin. Dabei bedeutet ein rotes Signal, dass dieses Gen nur in der basalen Transkription exprimiert wurde, also von Phr gehemmt wird. Das ist zum Beispiel bei *hsp20* der Fall. Ein grünes Signal steht für ein Gen, welches verstärkt in der Transkription mit Phr exprimiert wurde, also aktiviert wird. Die Auswertung eines Ausschnitts eines Microarrays mit der Falschfarbendarstellung ist in Abbildung 9 dargestellt.

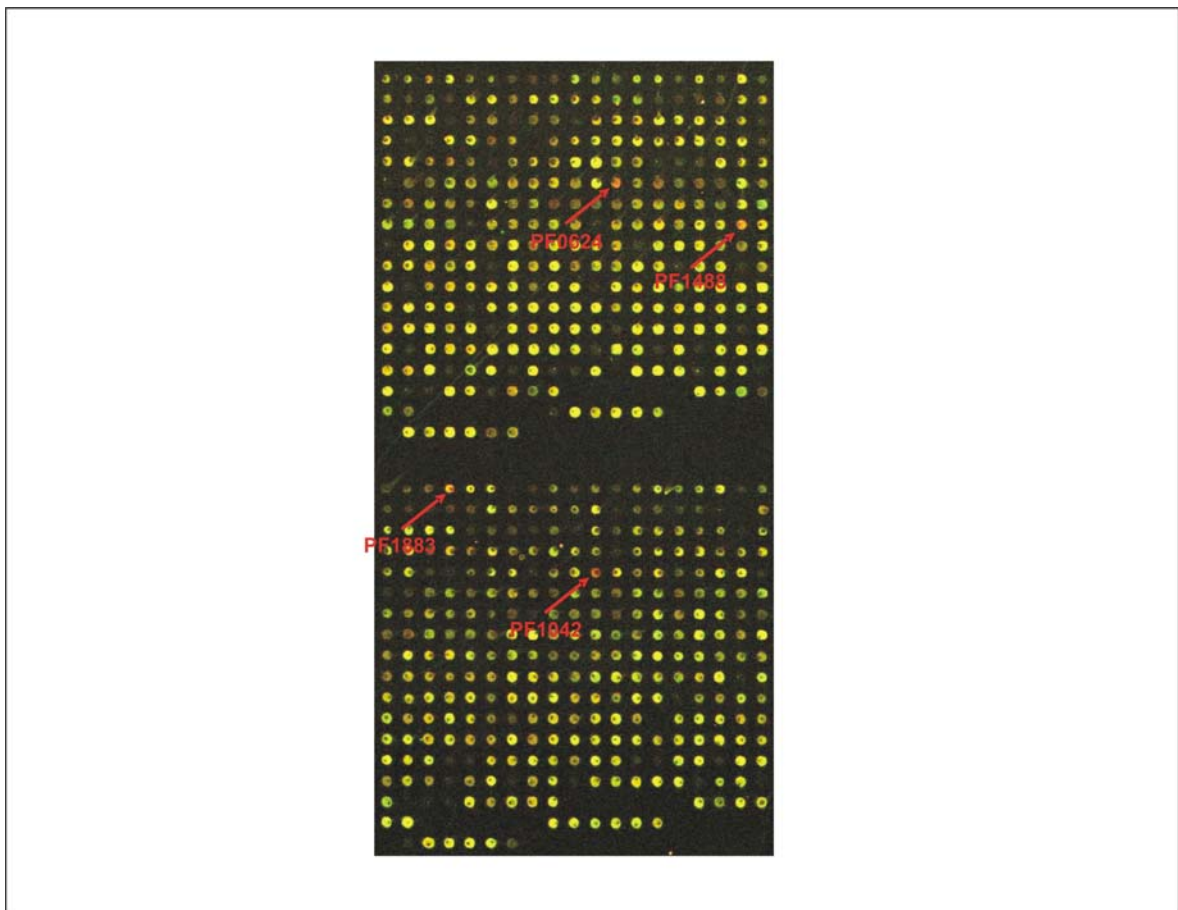


Abb. 9: Falschfarbendarstellung eines Microarrays

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines Microarrays, der zur Auswertung in Falschfarben dargestellt ist. Rote Signale, welche von Phr gehemmte Gene repräsentieren, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Um einen Microarray quantitativ auszuwerten wurde ein Streudiagramm (Scatter-Plot) erstellt. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten der basalen und der von Phr regulierten Transkription gegeneinander aufgetragen. Abbildung 10 zeigt zwei dieser Streudiagramme. Die meisten Punkte liegen auf einer Geraden, in Form einer Winkelhalbierenden. Sie repräsentieren Gene, welche nicht reguliert werden. Gene, deren Punkt von dieser Gerade abweicht, werden reguliert. Diese sind rot markiert. Der Punkt des Gens PF1883 ist grün dargestellt, da er den Punkt des Gens PF1488 überdeckt.

In Tabelle 3 ist die Auswertung von fünf Microarrays zusammengefasst. Die Gene deren Fluoreszenzintensitäten signifikante Abweichungen aufwiesen sind hier aufgelistet. Dabei wurden sie nach der Stärke der Abweichung geordnet. Das Gen *hsp20* (PF1883) wies die größten Expressionsunterschiede auf. Die Gene welche eine Phr-Bindestelle besitzen, sind farbig markiert und wurden in weitere Analysen eingesetzt.

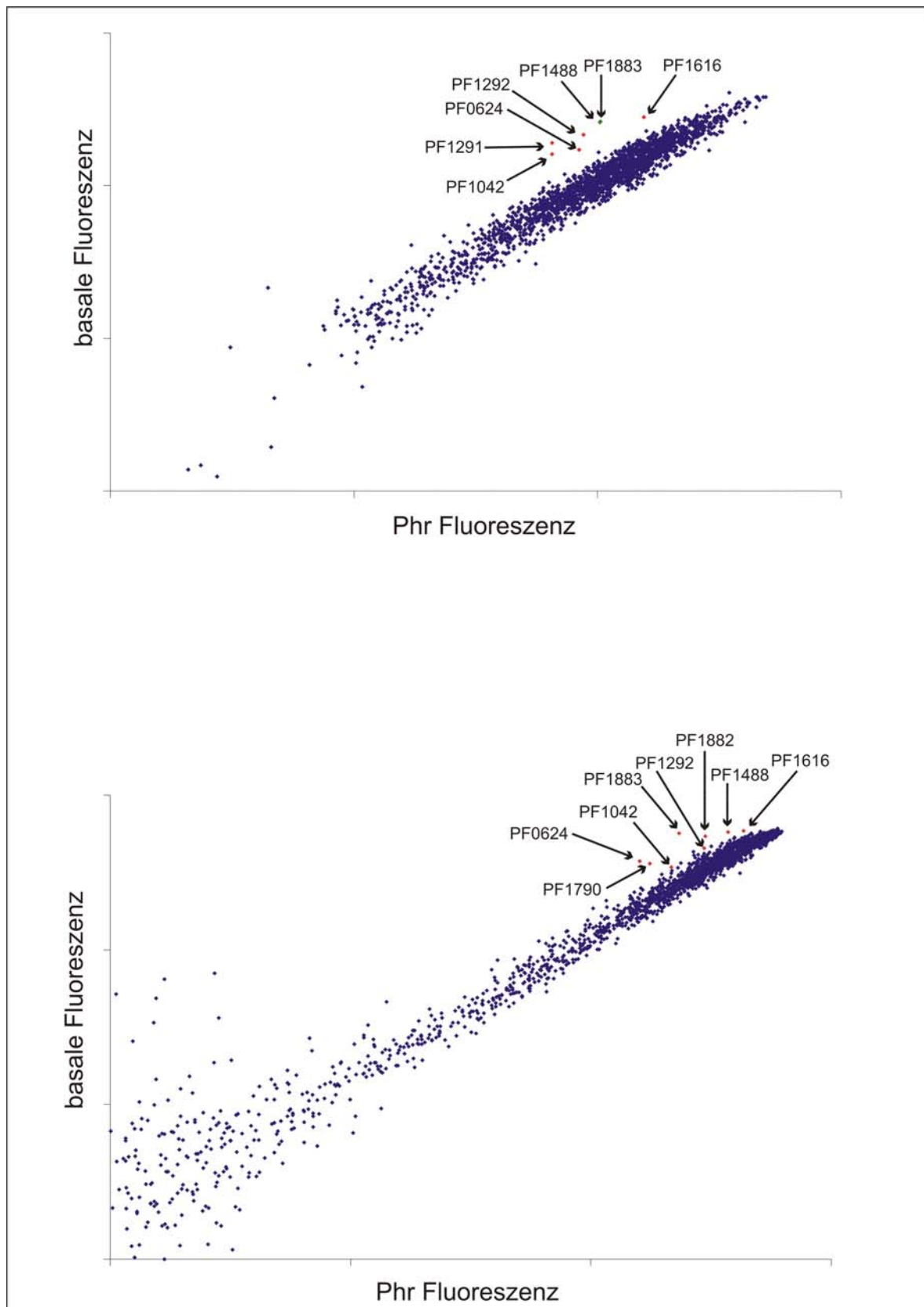


Abb. 10: Analyse zweier ROMA-Experimente durch Streudiagramme

In den Diagrammen sind die Fluoreszenzsignale der basalen Transkription gegen die der Transkription mit Phr aufgetragen. Bei gleicher Signalstärke liegen die Punkte auf der Winkelhalbierenden. Punkte deren Position abweicht, weisen eine unterschiedliche Signalstärke auf. Das entsprechende Gen wurde in den Transkriptionsansätzen unterschiedlich exprimiert. Die Punkte der von Phr regulierten Gene sind rot dargestellt. Der Punkt des Gens PF1883 ist grün abgebildet, da er den Punkt des Gens PF1488 überdeckt.

1	2	3	4	5
PF1883	PF1883	PF1883	PF1883	PF1931
PF1882	PF1488	PF1616	PF1882	PF1883
PF0624	PF1292	PF1488	PF1488	PF0799
PF1488	PF1616	PF0624	PF1616	PF1882
PF1790	PF1291			PF1888
PF0725	PF1042			PF1488
PF1292	PF0624			PF1072
PF1616				PF1187
PF0248				PF1790
PF0654				PF0624
PF0351				PF1316
PF0798				PF1616
PF0061				
PF1724				
PF0352				
PF0015				
PF1880				
PF1042				

Tab. 3: Analyse von fünf ROMA-Experimenten

Die Tabelle zeigt Gene deren Fluoreszenzsignale einen signifikanten Unterschied aufwiesen. Die Gene welche eine Phr-Bindestelle besitzen sind farbig markiert und wurden weiteren Analysen unterzogen.

1.4 Spezifische Transkriptionen der von Phr regulierten Gene

Durch die Microarray-Analysen konnten sechs neue Gene, welche eine Phr-Bindestelle besitzen und von Phr reguliert werden, identifiziert werden. Zur Kontrolle wurde jedes dieser Gene einzeln transkribiert. Hierfür wurde eine PCR amplifizierte Matrize, welche die zu untersuchende Promotorregion enthielt, in das *in vitro* Transkriptionssystem eingesetzt.

Abbildung 11A zeigt die Transkriptionsexperimente mit den neuen Genen. Dabei handelt es sich um PF0624, PF1042, PF1291, PF1292, PF1488 und PF1616. Es wurden unterschiedliche Mengen von Phr in die Transkription eingesetzt, wobei die jeweils erste Spur die basale Transkription ohne Phr zeigt. Unter jeder Spur ist die Transkriptionsaktivität aufgeführt, wobei die basale jeweils 100% entspricht.

Die separate Transkription der untersuchten Gene zeigt, dass sie alle von Phr reguliert werden, wenn auch unterschiedlich stark. Die Quantifizierung ergab, dass das Gen PF0624 am stärksten gehemmt wird. Am schwächsten erfolgt die Regulation bei dem Gen PF1292.

Auch die Gene PF1042, PF1291, PF1488 und PF1616 werden von Phr gehemmt.

Abbildung 11B zeigt die Transkriptionen der schon bekannten, von Phr regulierten Gene. Wie erwartet konnte bei *phr*, *hsp20* und der *aaa⁺atpase* die Hemmung durch Phr nachgewiesen werden. Das Gen für die Glutamatdehydrogenase (*gdh*) diente in diesem Experiment wie in den vorherigen als Kontrolle und wird wie erwartet nicht von Phr reguliert.

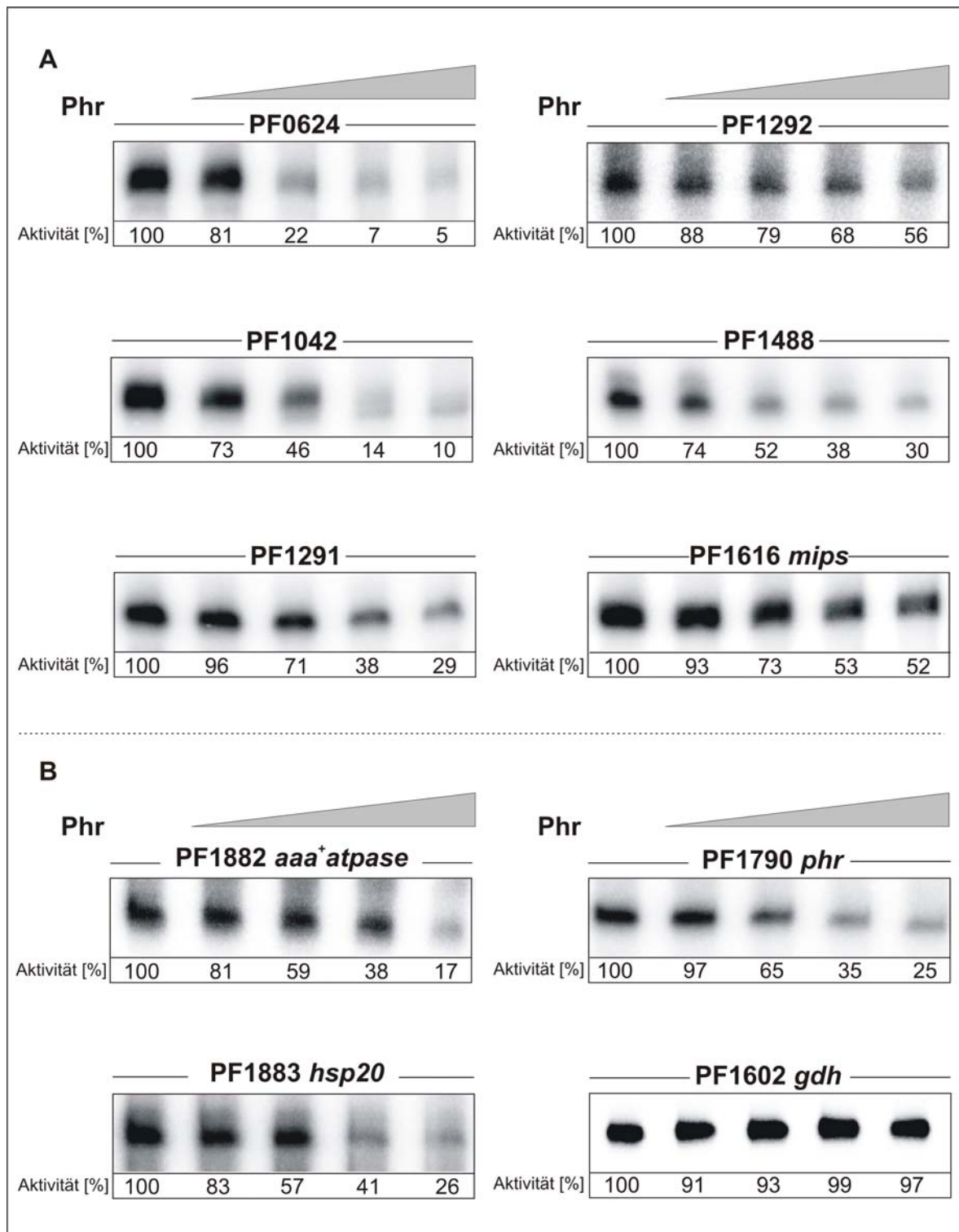


Abb. 11: *In vitro* Transkriptionen der neu identifizierten, von Phr regulierten Gene bestätigten die Befunde des ROMA-Experiments

(A) *In vitro* Transkriptionsexperimente der sechs neu identifizierten Gene, welche von Phr reguliert werden. (B) Kontrollexperiment mit den bereits bekannten von Phr regulierten Genen *aaa⁺atpase*, *hsp20* und *phr*. Die Transkription des Gens *gdh* wird wie erwartet nicht reguliert.

In die Reaktionen wurde 0, 50, 100, 150 und 200 nM Phr und 10 nM mittels PCR amplifizierte DNA-Matrize eingesetzt. Die Transkription wurde in 8%igen Harnstoffgelen untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Phosphoimager. Die Transkriptionsaktivität in Abwesenheit von Phr entspricht 100%.

In Abbildung 12 ist die Quantifizierung dieses Experiments in einem Diagramm zusammengefasst. Dieses präsentiert einen Vergleich der Transkriptionsaktivitäten aller von Phr regulierten Gene bei unterschiedlichen Konzentrationen. Das *gdh*-Gen wird wie erwartet nicht von Phr reguliert (rote Linie). Die bereits bekannten von Phr regulierten Gene werden gehemmt (schwarze Linien). Auch bei den neu identifizierten Genen nimmt die Transkriptionsaktivität ab (blaue Linien). Dabei wurde PF0624 am stärksten und PF1292 am schwächsten gehemmt.

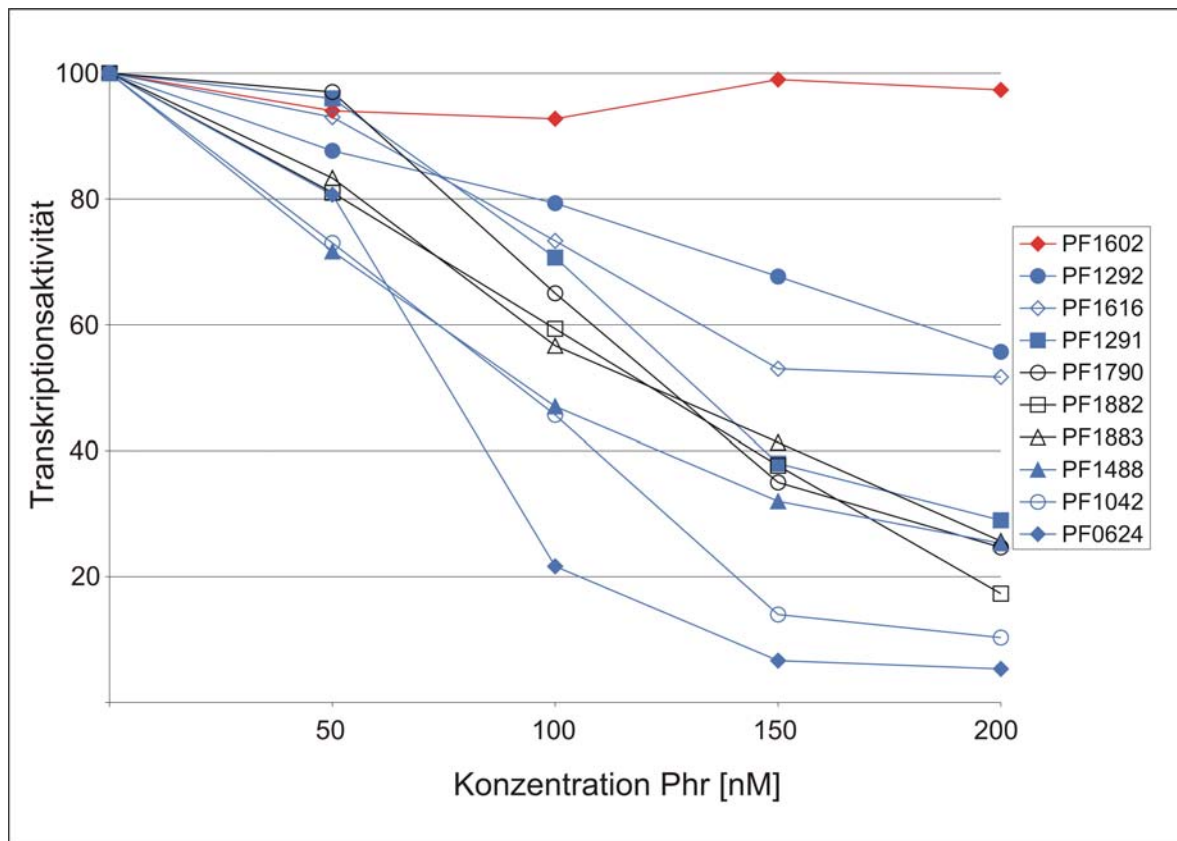


Abb. 12: Die Transkriptionsaktivität der von Phr regulierten Gene unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Regulators

Das Diagramm zeigt die Quantifizierung von *in vitro* Transkriptionen unterschiedlicher Promotoren, welche von Phr reguliert werden. Als Kontrolle diente *gdh*, welches nicht von Phr reguliert wird (rot). Neu identifizierte, von Phr regulierte Gene sind blau, zuvor identifizierte Gene sind schwarz dargestellt. In die Reaktionen wurde 0, 50, 100, 150 und 200 nM Phr und 10 nM mittels PCR amplifizierte DNA-Matrize eingesetzt. Die Transkriptionsaktivitäten wurden mit einem Phosphoimager ermittelt. Die Transkriptionsaktivität in Abwesenheit von Phr entspricht 100%.

1.5 Alignment der Promotorregion der von Phr regulierten Gene

Um die Binderegion von Phr genauer zu definieren, wurde ein Alignment von Promotorregionen aller von Phr regulierten Gene durchgeführt. Dafür wurde das Programm CLUSTALW verwendet.

Von (Liu et al., 2007) wurde als mögliche Erkennungssequenz das Palindrom 5'-TTTnnTnnCnnnnnGnnAnnAAA-3' vorgeschlagen. Diese Sequenz beruht auf Analysen der Promotorregion von *phr* (PF1790), *aaa⁺atpase* (PF1882) und *hsp20* (PF1883). Da durch die Microarray-Analyse neue Gene, welche von Phr reguliert werden, vorlagen, sollten diese Promotorregionen in eine neue Analyse einbezogen werden.

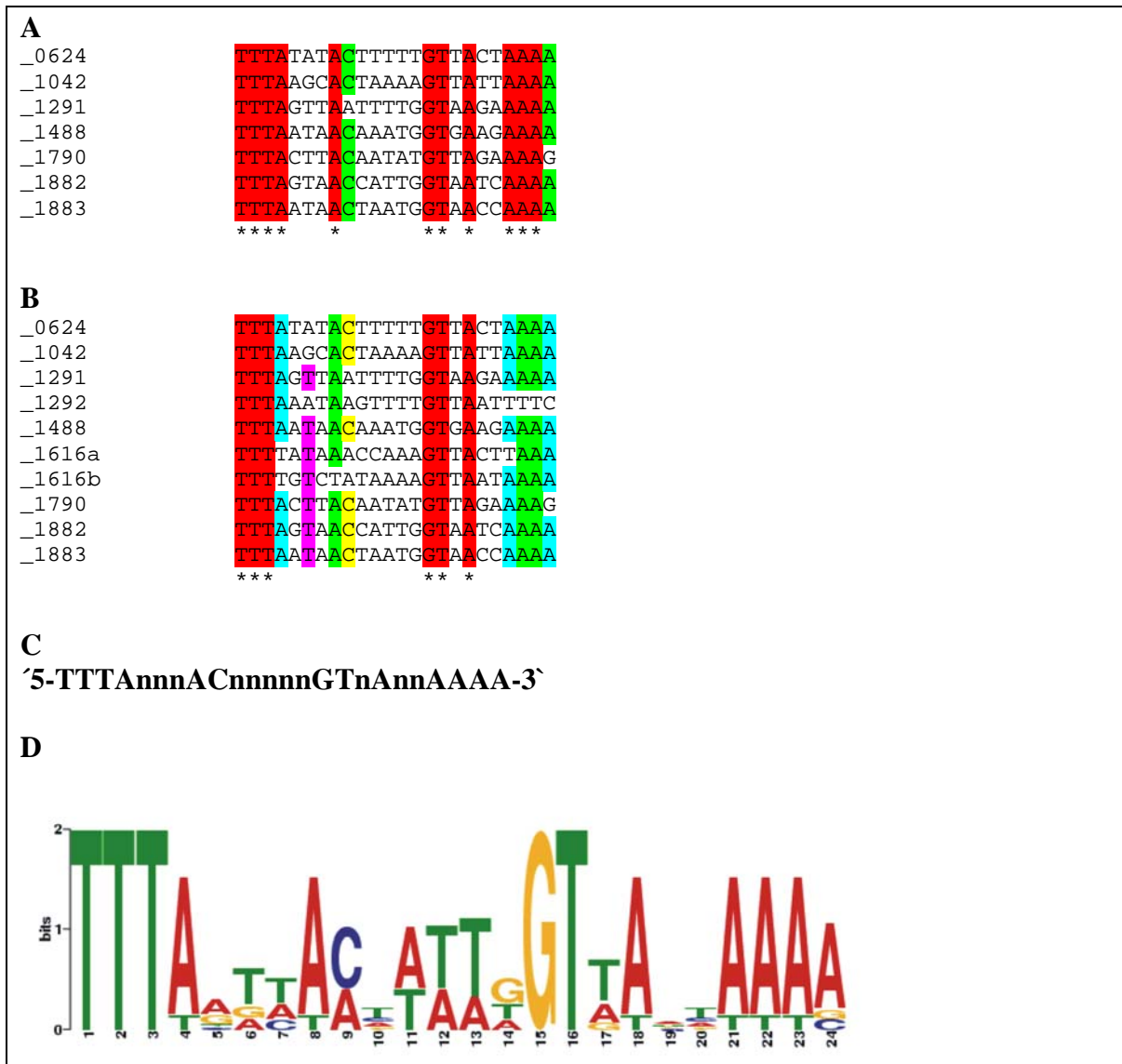


Abb. 13: Alignment der Promotorregionen, der von Phr regulierten Gene, führt zur Bestimmung einer neuen Konsensussequenz.

Die Promotorregionen der von Phr regulierten Gene wurden in ein Alignment eingesetzt. Dabei wurde das Programm CLUSTALW verwendet. (A) Alignment der stark von Phr regulierten Gene. (B) Alignment aller von Phr regulierten Gene. Basen, die in allen Promotoren vorkommen, sind rot markiert. Abweichungen in einer Position sind grün, in zwei Positionen blau, in drei Positionen violett und in vier Positionen gelb markiert. (C) Sequenz des Konsensusmotivs. (D) Das Sequenz-Logo wurde mit dem Programm MEME erstellt und bestätigt das Bindemotiv.

Abbildung 13A zeigt das Alignment der Gene PF0624, PF1042, PF1291, PF1488, PF1790, PF1882 und PF1883. Als Konsensussequenz ergibt sich hier 5'-TTTAnnACnnnnnGTnAnnAAAA-3'. Diese Sequenz beinhaltet die meisten Teile der bereits vorgeschlagenen Sequenz. Allerdings erweitert sich das Palindrom um ein Adenin an vierter, achter und vierundzwanzigster Position und um ein Thymin an sechzehnter Position. In diesem Alignment sind alle Gene aufgeführt, die stark von Phr reguliert werden.

Abbildung 13B zeigt das Alignment aller Promotorregionen, der von Phr regulierten Gene. Die Promotorregion von PF1616 weist zwei Phr-Bindestellen auf, die beide aufgeführt sind. Bei dem Gen für Phr (PF1790) und dem Gen PF1291 weicht die Erkennungssequenz um nur eine Base ab. Die beiden Bindestellen des Gens PF1616 weichen um je drei Basen ab. Am stärksten ist die Abweichung bei PF1292. Die Bindestelle unterscheidet sich hier um fünf Basen von der Konsensussequenz.

Zur Kontrolle wurden die Promotorregionen mit dem Programm MEME (Bailey und Elkan, 1994) analysiert und ein Sequenzlogo erstellt (Abb. 13D). Diese Analyse bestätigte das in dieser Arbeit vorgeschlagene Phr-Bindemotiv.

1.6 Analyse der Promotoren der von Phr regulierten Gene

```

atacGaaaccttgaacatcgaaattttatatactttttgttactaaaaatatctgggaggtgaggagaaATG
PF0624

ttaattctctttatatgcatttacctaaaatttttaagactaaaagtattaaaaatttggtgatgaaaaATG
PF1042

aagaatagaaacatttaaaaacccctaagaatttagttaattttggtagaataatcgggaggtgggaaaATG
PF1291

catccaaccacctaaggtaaagcgggagatattttttaataagttttgttaattttcgctcgatatccATG
PF1292

ggaataaatacttttctcaccaaatgatttaaaaaggtaaaagaatttaataacaaatgtgaagaaaaATG
PF1488

aaaacaaatattgtcggcgaaatttttataaaccaaagttaacttaaaagtagattggcctttgtaggtcattc
tgacttttgtctataaaagttaataaaaagaattcacaccaatttttagcaaacaggaggtgaggactgATG
PF1616, mips

ggaaacgaaaaagcttaaaattaagttttacttacaatatgttagaaaagcgagaatagggtgaggtgagATG
PF1790, phr

atatcgaaaacttttataaaccttaagagttttagtaaccattggtaatcaaaatattgaggtgaggaaagATG
PF1882, aaa+atpase

atcgaaatatttataaaccccaaataatttaataactaatggttaacaaaaagtgaggaggggtgagagagATG
PF1883, hsp20

```

Abb. 14: Die Bindestelle von Phr befindet sich stromabwärts der TATA-Box

Analyse der Promotorregion der von Phr regulierten Gene. Das Phr Bindemotiv ist rot gekennzeichnet. Die wahrscheinliche TATA-Box ist umrandet und das BRE unterstrichen. Der Translationsstart ist durch große Buchstaben gekennzeichnet.

Die Promotorregion der im Microarray regulierten Gene wurde untersucht. Dabei wiesen die Gene PF0624, PF1042, PF1291, PF1292, PF1488, PF1616, PF1790, PF1882 und PF1883 eine Phr-Bindestelle auf. Im Promotorbereich von PF1616 wurden zwei Bindemotive entdeckt. Die Phr-Bindestellen befinden sich, wie schon für die Gene *phr*, *aaa⁺atpase* und *hsp20* beschrieben, stromabwärts der TATA-Box (Vierke et al., 2003).

1.7 Analyse der Bindestellen von Phr am Gen der *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase

Die Promotorregion des Gens der *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase (PF1616, *mips*) weist zwei mögliche Bindestellen für Phr auf. Um zu analysieren, ob beide von Phr erkannt werden, wurden EMSA Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Promotorregion in drei Teile aufgeteilt, wobei nur die Bereiche a und b je eine Phr-Binderegion enthielten

(Abb. 15A). Der Bereich c diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde die Promotorregion des *aaa⁺atpase*-Gens in die Analysen eingesetzt (d). Die Regionen wurden in Form von doppelsträngigen Oligonukleotiden mit und ohne Phr für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf ein nicht denaturierendes 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

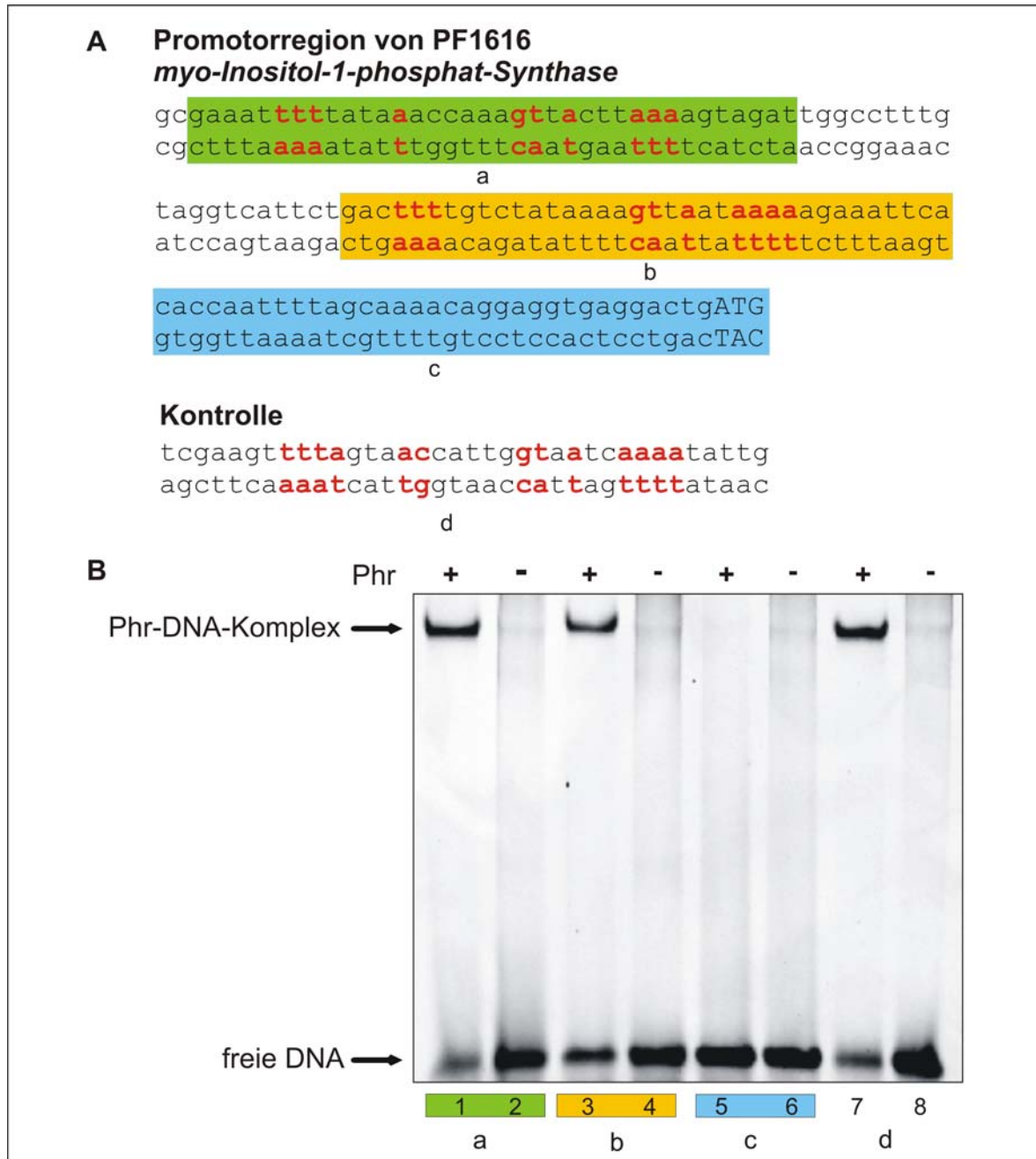


Abb. 15: Der Promotor des Gens der *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase weist zwei Bindestellen für Phr auf

(A) Analyse von drei Regionen (a,b,c) des *mips*-Promotors, wobei nur a und b eine Phr-Bindestelle aufweisen. Die Phr-Bindestelle des *aaa⁺atpase*-Gens diente als Positivkontrolle (d). (B) EMSA der vier Promotorregionen. Für jede zu untersuchende Promotorregion wurde eine Reaktion mit und eine ohne Phr angesetzt. In das EMSA-Experiment wurden 2.1 µM DNA mit und ohne 10 µM Phr 10 min bei 70°C inkubiert. Die Analyse erfolgte auf einem 6%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel.

Wie Abbildung 15B zeigt, bindet Phr an die Regionen a und b und verursacht einen Shift. Somit konnte die Bindung an beide Regionen auf dem *mips*-Promotor nachgewiesen werden.

An die Region c, welche keine Phr-Bindestelle besitzt, bindet Phr wie erwartet nicht. Wie bereits bekannt, bindet Phr an den Promotor der *aaa⁺atpase* (d).

1.8 Analyse des Genoms von *Pyrococcus furiosus* nach der Bindestelle von Phr

Da neue Erkenntnisse über die Erkennungssequenz von Phr vorlagen, sollte das Genom von *Pyrococcus furiosus* nach dieser Sequenz durchsucht werden. Dafür wurde der „sort sequence locator“ eingesetzt (Bikandi et al., 2004). Es wurde analysiert, ob es noch weitere Gene gibt, bei denen diese Sequenz im Promotorbereich zu finden ist.

Die Analyse ergab, dass die Konsensussequenz 5'-TTTAnnnACnnnnnGTnAnnAAA(A)-3' insgesamt sechsmal im Genom von *Pyrococcus furiosus* vorkommt und zwar im Promotorbereich der Gene PF0624, PF1042, PF1488, PF1790, PF1882 und PF1883 (Abb.16A). Bei all diesen Genen ist die Regulation durch Phr mit ROMA und Transkriptionsanalysen nachgewiesen worden. Bei dieser Sequenzsuche wurde das Adenin an letzter Stelle nicht berücksichtigt. Fügt man es hinzu, fällt lediglich das Gen für *phr* (PF1790) weg.

Des Weiteren wurden die Sequenzen untersucht, die leicht von der Bindesequenz abweichen. Bei der Erkennungssequenz des Gens PF1291 fehlt das Cystein an Position neun. Die genomweite Untersuchung ergab, dass zusätzlich zu den bereits identifizierten Genen, die Gene PF0321 und PF0895 diese Sequenz aufweisen. Allerdings befindet sich das Motiv im Fall von PF0321 auf dem gegenüberliegenden Strang und bei PF0895 mitten im Gen (Abb. 16B).

Die Phr- Erkennungssequenz von PF1292 weicht sehr stark von der Konsensussequenz ab. Die Analyse des Genoms ergab, dass die Sequenz fünfmal vorkommt. Sie liegt stromaufwärts der TATA-Box (PF0867) oder nicht auf demselben Strang (PF1889 und PF0868). Bei dem Gen PF0758 liegt das Motiv wahrscheinlich hinter dem Transkriptionsstart und bei PF2043 mitten im Gen (Abb. 16C).

Das Phr-Bindemotiv des Gens PF1616 (1616a) kommt noch bei vier weiteren Genen vor. Zwei Mal befindet sich die Bindestelle im ORF (PF0085, PF1878) und zwei Mal nicht auf demselben Strang wie das Gen (PF0034, PF0321), (Abb. 16D).

Das Motiv für PF1616b ist neunzehn Mal im Genom zu finden. Neben den Genen, von denen bereits bekannt ist, dass sie durch Phr reguliert werden (PF0624, PF1291, PF1488, PF1616, PF1790, PF1882, PF1883), befindet sich das Motiv bei zwölf anderen Genen.

Bei sieben dieser Gene befindet sich das Motiv im ORF (PF1072, PF1675, PF1836, PF0835, PF0895, PF1005, PF1465) oder nicht auf dem gleichen Strang (PF0321, PF1328, PF0090, PF0602). Bei dem Gen PF0594 liegt das Motiv vor der TATA-Box (Abb.16E).

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die Analyse noch weitere Phr-Bindemotive entdeckt wurden, doch wahrscheinlich liegen sie nicht stromabwärts der TATA-Box und überdecken den Transkriptionsstart, wie bei den von Phr gehemmten Genen (Abb.14). Die Bindestellen befinden sich im ORF, vor der TATA-Box oder hinter dem Transkriptionsstart. Wichtig für eine Regulation ist auch, dass sich Bindemotiv und Gen auf demselben Strang befinden (Abb.16A).

Die Analyse des Genoms von *Pyrococcus furiosus* unterstützt somit die Befunde des ROMA-Experiments.

A

5'-TTTA NNN AC NNNNN GTN ANN AAA-3'

	Position	Strang	Motiv	ORF (Strang)
1	995447	+	TTTAAGCACTAAAAGTTATTAAA	PF1042 (+)
2	1389956	+	TTTAATAACAAATGGTGAAGAAA	PF1488 (+)
3	1664087	+	TTTACTTACAATATGTTAGAAAA	PF1790 <i>phr</i> (+)
4	640869	-	TTTAGTAACAAAAAGTATATAAA	PF0624 (-)
5	1736343	-	TTTGATTACCAATGGTTACTAAA	PF1882 <i>aaa⁺atpase</i> (-)
6	1737020	-	TTTGGTTACCATTAGTTATTAAA	PF1883 <i>hsp20</i> (-)

B

5'-TTTA NNN NNNNNN GTN ANN AAAA-3'

	Position	Strang	Motiv	ORF (Strang)
1	337315	+	TTTAGTAAACTTTGGTTAATAAAA	PF0321 (-)
2	995447	+	TTTAAGCACTAAAAGTTATTAAAA	PF1042 (+)
3	1217810	+	TTTAGTTAATTTTGGTAAGAAAAA	PF1291 (+)
4	1389956	+	TTTAATAACAAATGGTGAAGAAAA	PF1488 (+)
5	640868	-	TTTTAGTAACAAAAAGTATATAAA	PF0624 (-)
6	868115	-	TTTTATTAACTTTAACTCCATAAA	im Gen PF0895(-)
7	1736342	-	TTTTGATTACCAATGGTTACTAAA	PF1882 (-)
8	1737019	-	TTTTGGTTACCATTAGTTATTAAA	PF1883 (-)

C

5'-TTTA NNN NNNNNN GTN ANN TTT-3'

	Position	Strang	Motiv	ORF (Strang)
1	1742840	+	TTTAAAAATGTTATGTGATTTTT	PF1889 (-)
2	753407	-	AAATTTAACTAAAAATAATTAAA	PF0758 (-)
3	841555	-	AAAATTAACCACATTGAGTAAA	zwischen PF0867 (-) PF0868 (+)
4	1219881	-	AAAATTAACAAAACTTATTTAAA	PF1292 (-)
5	1884979	-	AACTTCACAAAGACTCCATAAA	im Gen PF2043(-)

D

5'-TTTNNNNNNNNNNGTNANNAAAA-3'

	Position	Strang	Motiv	ORF (Strang)
1	41005	+	TTTATTGAGTCTTTGTTATTTAAA	PF0034 (-)
2	92843	+	TTTCTTAAAAGTAGGTTAGAGAAA	im Gen PF0085 (-)
3	337315	+	TTTAGTAAACTTTGGTTAATAAAA	PF0321 (-)
4	1217810	+	TTTAGTTAATTTTGGTAAGAAAAA	PF1291 (+)
5	1389956	+	TTTAATAACAAATGGTGAAGAAAA	PF1488 (+)
6	1508361	+	TTTTATAAACCAAAGTTACTTAAA	PF1616a (+)
7	1731273	+	TTTCTTGAAAAAAGGTTAAACAAA	im Gen PF1878 (+)
8	1736343	+	TTTGATTACCAATGGTTACTAAAA	PF1882 (-)
9	1664086	-	TTTTACTTACAATATGTTAGAAAA	PF1790 (+)
10	1736342	-	TTTTGATTACCAATGGTTACTAAA	PF1882 (-)
11	1737019	-	TTTTGGTTACCATTAGTTATTAAA	PF1883 (-)

E

5'-TTTNNNNNNNNNNNNGTNANNAAAA-3'

	Position	Strang	Motiv	ORF (Strang)
1	337315	+	TTTAGTAAACTTTGGTTAATAAAA	PF0321 (-)
2	1023262	+	TTTAGGAGAGGAGGGTGAAGAAAA	im Gen PF1072(+)
3	1217810	+	TTTAGTTAATTTTGGTAAGAAAAA	PF1291 (+)
4	1249883	+	TTTAAATTCCTAAGGTAATAAAA	PF1328 (-)
5	1389956	+	TTTAATAACAAATGGTGAAGAAAA	PF1488 (+)
6	1508415	+	TTTTGTCTATAAAAGTTAATAAAA	PF1616b (+)
7	1558534	+	TTTCGGTGAGAGTAGTGAAGAAAA	im Gen PF1675(+)
8	1692308	+	TTTTAGCAATTGGAGTTATGAAAA	im Gen PF1836(+)
9	96584	-	TTTTATTTACTTTTTGCATTAAAA	PF0090 (+)
10	616131	-	TTTAATAACCCTTTCGTCGGAAA	PF0594 (-)
11	622455	-	TTTTTATTACCCGGGGGTGATAAA	PF0602 (+)
12	640868	-	TTTTAGTAACAAAAAGTATATAAA	PF0624 (-)
13	811833	-	TTTCCTCACCATGCCACCCGAAA	im Gen PF0835(-)
14	868115	-	TTTTATTAACTTTAACCCATAAA	im Gen PF0895(-)
15	962873	-	TTTTGATGACGCTGAGATAATAAA	im Gen PF1005(+)
16	1373060	-	TTTTTCTAACTCTCATATTTAAA	im Gen PF1465(+)
17	1664086	-	TTTTACTTACAATATGTTAGAAAA	PF1790 (+)
18	1736342	-	TTTTGATTACCAATGGTTACTAAA	PF1882 (-)
19	1737019	-	TTTTGGTTACCATTAGTTATTAAA	PF1883 (-)

Abb. 16: Sequenzanalyse des Genoms von *Pyrococcus furiosus*

Das gesamte Genom wurde nach der Bindestelle von *Pyrococcus furiosus* durchsucht. Dabei wurden unterschiedliche Motive der Bindestequence eingesetzt. (A) Suche nach der Bindestequence von *phr*, *hsp20*, *aaa⁺atpase*, PF0624, PF1042 und PF1488. (B) Suche nach der Bindestequence von PF1291. (C) Suche nach der Bindestequence von PF1292. (D+E) Suche nach den Bindestesequenzen von PF1616a und PF1616b. Die Bindestequence wurde auch bei Genen entdeckt, welche nicht im Microarray vorkamen. Es ist aber unwahrscheinlich, dass sie von Phr reguliert werden, da sich die jeweilige Bindestelle auf dem gegenüberliegenden Strang, vor der TATA-Box oder hinter dem Transkriptionsstart befindet.

1.9 BLAST-Analyse der hypothetischen Proteine

Bei den neu identifizierten Genen, welche von Phr reguliert werden, handelt es sich mit Ausnahme des Gens für die *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase um hypothetische Proteine. Um etwas über ihre mögliche Funktion zu erfahren, wurde nach Homologen dieser Proteine gesucht. Dies erfolgte durch BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Analysen, in welche die Proteinsequenz der zu untersuchenden Gene eingesetzt wurde. Dabei wurde das BLAST-Programm PSI-BLAST (Position-Specific Iterated-BLAST) von NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwendet (Altschul et al., 1997). Es wurden fünf Iterationsschritte durchgeführt, dabei betrug der Threshold 0,005.

Die BLAST-Analysen von PF0624, PF1042 und PF1488 ergaben, dass diese Proteine Homologe in Archaea und Bacteria besitzen, diese aber auch nur als hypothetische Proteine beschrieben werden. Im Folgenden wird kurz auf die jeweils ersten zehn angezeigten Proteine eingegangen.

Bei der Analyse von PF0624 waren unter den ersten zehn Homologen vier Vertreter aus dem Reich der *Euryarchaeota*, vier grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt und zwei *Cyanobacteria*. Unter den *Euryarchaeota* waren nur Vertreter der Familie der *Thermococcaceae*, darunter *Pyrococcus*- und *Thermococcus*-Arten. Des Weiteren besitzt das Protein eine konservierte Domäne (DUF1931), deren Funktion noch unbekannt ist.

Die BLAST-Untersuchung von PF1042 ergab fünf homologe Proteine. Diese gehörten alle zu Vertretern der *Euryarchaeota* und der Familie der *Thermococcaceae*. Dabei waren zwei *Pyrococcus*- und drei *Thermococcus*-Arten vertreten.

Unter den ersten zehn Homologen Proteinen von PF1488 befanden sich sieben aus Archaeen. Sie gehörten alle zur Familie der *Thermococcaceae* von der verschiedene *Pyrococcus*- und *Thermococcus*-Arten vertreten waren. Des Weiteren wurden zwei Proteine der *Proteobacteria* und eines der *Aquificaceae* angezeigt.

Die BLAST-Analysen von PF1291 und PF1292 gaben einige Hinweise auf die mögliche Funktion der Proteine.

Unter den ersten zehn Homologen von PF1291 waren acht Proteine der *Euryarchaeota*. Dabei handelte es sich um hypothetische Proteine, sowie Metallophosphoesterasen und Phosphodiesterasen unterschiedlicher *Pyrococcus*- und *Thermococcus*-Arten. Außerdem wurden ein hypothetisches Protein aus *Cyanobacteria* und eine Phosphodiesterase der *Thermotogales* angezeigt.

Es wurde jedoch auch festgestellt, dass das Protein von PF1291 eine konservierte ApaH Domäne besitzt und zur PP2Ac-Superfamilie gehört. Die ApaH-Domäne kommt bei Diadenosin-Tetraphosphatasen und verwandten Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen vor. Diese sind an Signaltransduktionsmechanismen beteiligt.

Bei der Analyse von PF1292 waren unter den ersten zehn Homologen nur Vertreter der Bacteria. Darunter neun Proteine der *Firmicutes*. Es wurden unterschiedliche Proteine von *Lactobacillus*- und *Streptococcus*-Arten angezeigt, welche im Polysaccharidstoffwechsel eine Rolle spielen. Darunter war auch ein Protein der *Proteobacteriaceae*, welches ebenfalls an der Polysaccharidbiosynthese beteiligt ist.

Um die Ergebnisse abzusichern wurde das Programm HHsenser verwendet (Soding et al., 2006). Die Resultate bestätigten die obigen Aussagen. Allerdings konnten sie um einige Punkte erweitert werden.

Die Analyse ergab, dass PF0624 eine Histon-Falte (histone fold) besitzt. Außerdem ist die Struktur für drei homologe Proteine von PF0624 bereits bekannt. Dabei handelt es sich um ein hypothetisches Protein von *Thermus thermophilus* (PDB ID: 1wwi), ein hypothetisches Protein von *Aquifex aeolicus* (PDB ID: 1r4v) und ein Histon-Protein von *Methanopyrus kandleri* (PDB ID: 1f1e).

Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Struktur von PF1291 bereits bekannt ist (PDB ID: 1nnw).

PF1292 gehört zur Proteinfamilie Pfam01943. Mitglieder dieser Familie sind an der Polysaccharidbiosynthese beteiligt und integrale Membranproteine.

PF1042 besitzt eine Ruberythrin-Domäne und gehört zur Familie der Ferritrine-like-Archaea and Bacteria. Die Struktur eines Vertreters dieser Familie ist bereits bekannt. Dabei handelt es sich um ein Protein aus *Thermotoga maritima* (PDB ID: 1VJX).

2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Transkriptionsregulators SurR von *Pyrococcus furiosus*

In diesem Abschnitt wird die Charakterisierung des neuen Transkriptionsregulators SurR beschrieben. Dabei wurde seine Funktion bei der Regulation spezifischer Gene untersucht und die Transkriptionsstartpunkte dieser Gene bestimmt. Außerdem wurden Versuche zur Regulation der Bindeaktivität von SurR durchgeführt.

2.1 SurR reguliert die Transkription als Aktivator und Repressor

Um die Funktion von SurR als Transkriptionsregulator nachzuweisen, wurde das Protein im *in vitro* Transkriptionssystem untersucht, wobei Promotorregionen unterschiedlicher Gene als Matrizen eingesetzt wurden. Diese besaßen mindestens ein Bindemotiv für SurR, dessen Erkennung durch SurR bereits durch EMSA oder Footprint-Analysen nachgewiesen wurde (Lipscomb et al., 2009). Des Weiteren belegten Microarray-Daten, dass die zu untersuchenden Gene in Gegenwart von Schwefel stärker oder schwächer exprimiert werden (Schut et al., 2007).

Bei den Transkriptionsanalysen wurde die Regulation der beiden Gene *mbh1* (PF1423) und *hydBI* (PF0891) untersucht, die beide während der Schwefelantwort *in vivo* negativ reguliert werden, als auch das Gen *nsr* (PF1186) dessen Transkription *in vivo* aktiviert wird.

In die *in vitro* Transkriptionen wurden mittels PCR synthetisierte Matrizen, welche die Promotorregion des jeweiligen Gens enthielten, eingesetzt. Bei der Matrize von *mbh1* war auch der Promotor für das gegenüberliegende Gen (*Thioredoxin-Reduktase*, PF1422) vorhanden, da sonst nicht die gesamte SurR-Binderegion analysiert werden konnte. Das Gen PF1422 wurde in der *in vitro* Transkription allerdings nicht transkribiert, so dass nur das Transkriptionsprodukt von PF1423 vorlag. In Transkriptionsanalysen, in welche nur die Promotorregion von PF1422 eingesetzt wurde, erfolgte eine Transkription dieses Gens, welches aber nicht von SurR reguliert wurde.

In Abb. 17 sind die Transkriptionsexperimente der drei Gene mit steigenden Mengen von SurR dargestellt, wobei in der jeweils ersten Spur die basale Transkription ohne den Regulator aufgetragen ist. Die Transkription von *mbh1* (PF1423) wurde durch SurR nur leicht aktiviert. Sie stieg um 56% (Abb.17A).

Im Gegensatz dazu aktivierte SurR die Transkription von *hydBI* (PF0891) drastisch. Die Transkriptionsaktivität stieg auf 360% (Abb.17B).

Wie erwartet hemmte SurR die Transkription von *nsr* (PF1186). Dabei ging die Transkriptionsaktivität um fast 70% zurück (Abb.17 C).

Als Kontrollexperiment wurde auch der Promotor des *gdh*-Gens in die *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Wie in den jeweils letzten beiden Spuren zu erkennen ist, hat SurR keinen Einfluss auf die Transkription von *gdh*. Der Unterschied der Transkriptionsaktivität zwischen basaler Transkription und Transkription mit SurR liegt bei weniger als 10%.

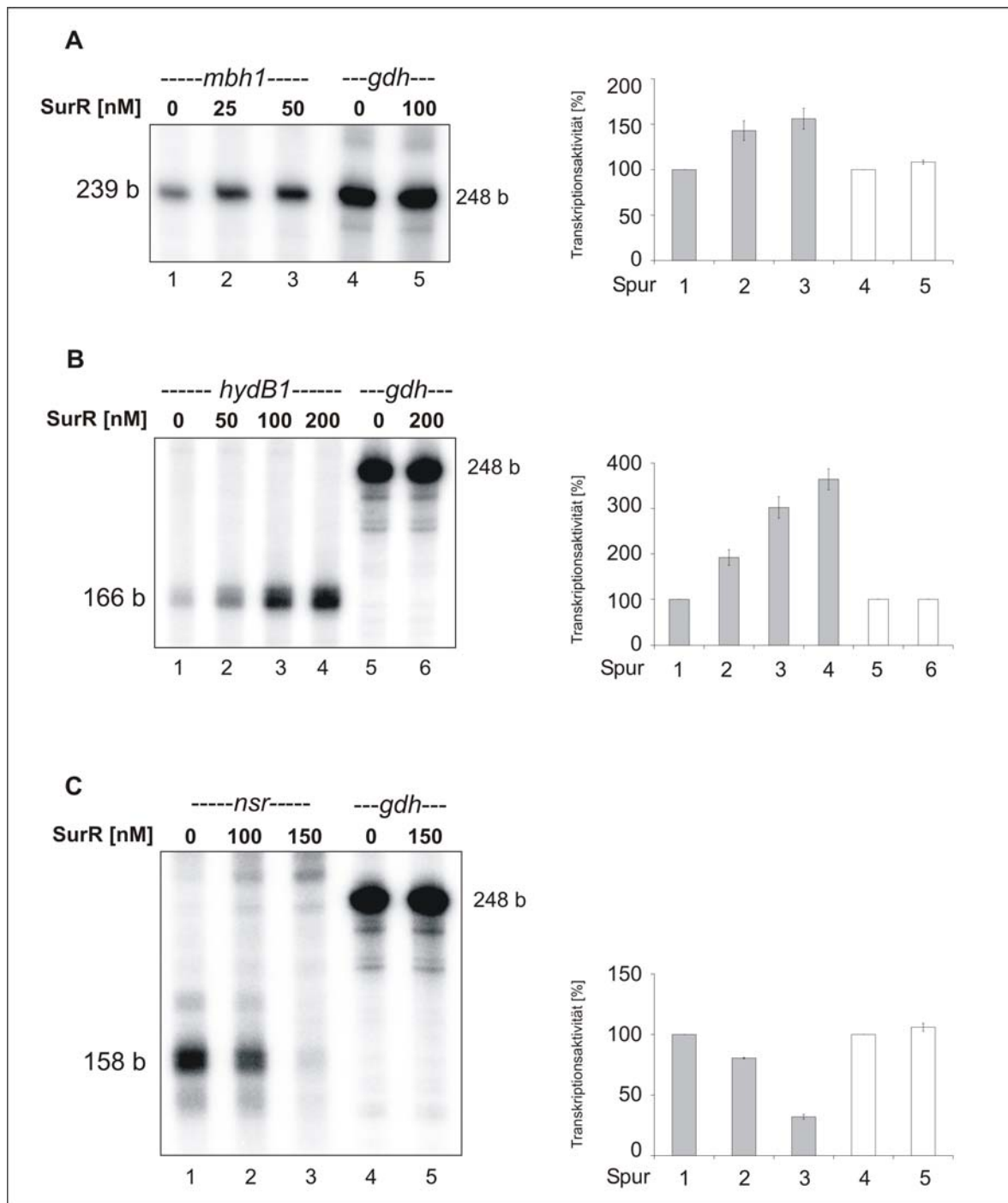


Abb. 17: SurR reguliert die Transkription der Gene *mbh1*, *hydB1* und *nsr* in vitro.

(A) SurR aktiviert die Transkription von *mbh1*. (B) SurR aktiviert die Transkription von *hydB1*. (C) SurR hemmt die Transkription von *nsr*. In die *in vitro* Transkriptionsreaktionen wurden steigende Mengen von SurR eingesetzt und unterschiedliche Konzentrationen PCR-amplifizierter Matrizen: 10 nM *mbh*, 25 nM *hydB1*, 25 nM *nsr* und 10 nM *gdh*. Die Transkriptionen wurden auf einem 8%igen PA-Harnstoffgel analysiert und die Signale quantifiziert. Die Ansätze ohne SurR entsprechen 100% Transkriptionsaktivität. Die Quantifizierung ist in den Diagrammen dargestellt. Dabei ist die Transkriptionsaktivität bei den regulierten Genen grau und bei der *gdh*-Kontrolle weiß abgebildet.

2.2 SurR reguliert die Transkription seines eigenen Gens

Das Gen für SurR befindet sich 132 bp stromabwärts, des in die Gegenrichtung orientierten Gens *pdo* (PF0094). Dieses Gen, welches für eine Protein-Disulfid-Oxidoreduktase codiert, wird in der Gegenwart von Schwefel verstärkt exprimiert. Durch EMSA Experimente konnte die Bindung von SurR nachgewiesen werden. Außerdem ergaben Footprint-Analysen eine große Binderegion, welche sich von der Position -5 bis -89 relativ zum Translationsstart von *pdo* und von Position -44 bis -128 relativ zum Translationsstart von *surR* erstreckte. Es war somit notwendig, die gesamte Promotorregion beider Gene mit einer Matrize zu untersuchen und zur Kontrolle je eine Transkription mit dem einzelnen Gen durchzuführen (Abbildung 18). In Abbildung 19A ist die *in vitro* Transkription beider Gene von einer Matrize dargestellt. Die basale Transkription zeigte eine starke Expression von *pdo*, wobei *surR* nur sehr schwach exprimiert wurde. Durch die Zugabe von SurR nahm die Transkription von *pdo* um ungefähr das Fünffache ab (dunkle Balken), während sich die Transkription von *surR* auf das Dreifache erhöhte (helle Balken). Bei der Transkriptionsreaktion wurde ein unspezifisches Transkriptionsprodukt, welches etwas größer als das *surR*-Transkript ist, gebildet. Es könnte sich dabei um ein Artefakt oder um ein Abbauprodukt der RNA handeln.

Um nachzuweisen, dass die Aktivierung von *surR* nicht mit der Hemmung von *pdo* und der damit verbundenen Verfügbarkeit von mehr RNAP und Transkriptionsfaktoren zusammenhängt, wurden die beiden Gene unabhängig voneinander auf separaten Matrizen transkribiert (Abb. 19 B, C). Wie erwartet nahm auch hier die Transkriptionsaktivität bei *pdo* ab und zwar sank sie auf 42%. Im Gegensatz dazu nahm die Transkriptionsaktivität bei *surR* um fast die Hälfte zu, obwohl nur ein Drittel der Footprintregion und nur eine der beiden GTT₃AAC-Motive auf der *surR*-Matrize vorhanden waren.

Wie zuvor wurde bei allen Transkriptionen auch eine Kontrolle mit dem Promotor des *gdh*-Gens durchgeführt. Wie zu erwarten regulierte SurR die Transkription dieses Gens nicht (weiße Balken, die letzten beiden Spuren).

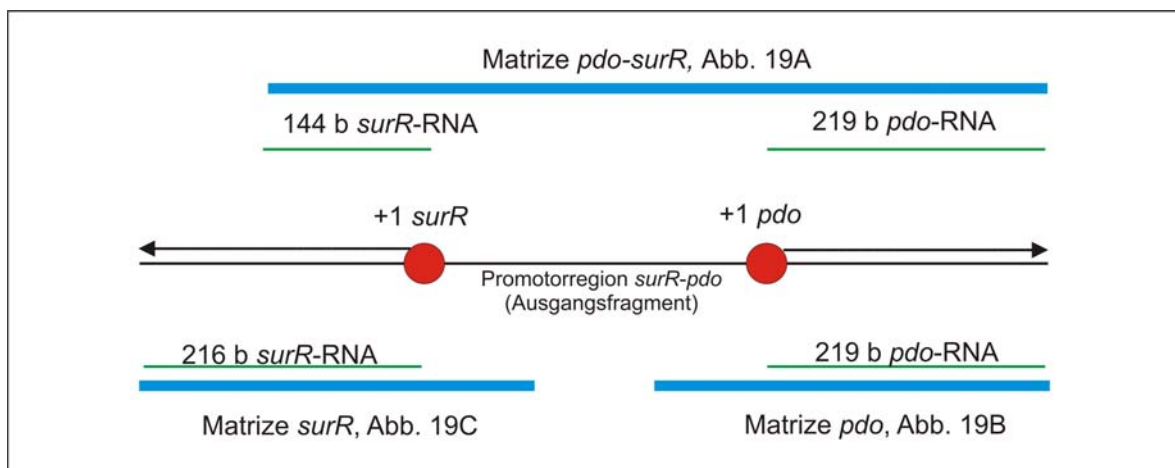


Abb. 18 : Matrizen, welche in die Transkriptionsanalysen der Abb. 19 eingesetzt wurden

In der Mitte ist die Promotorregion *pdo-surR* abgebildet. Der Transkriptionsstart ist durch einen roten Punkt und die Transkriptionsrichtung durch einen Pfeil dargestellt. Die RNA-Produkte sind grün und die DNA-Matrizen, welche in die Transkriptionen eingesetzt wurden, blau abgebildet.

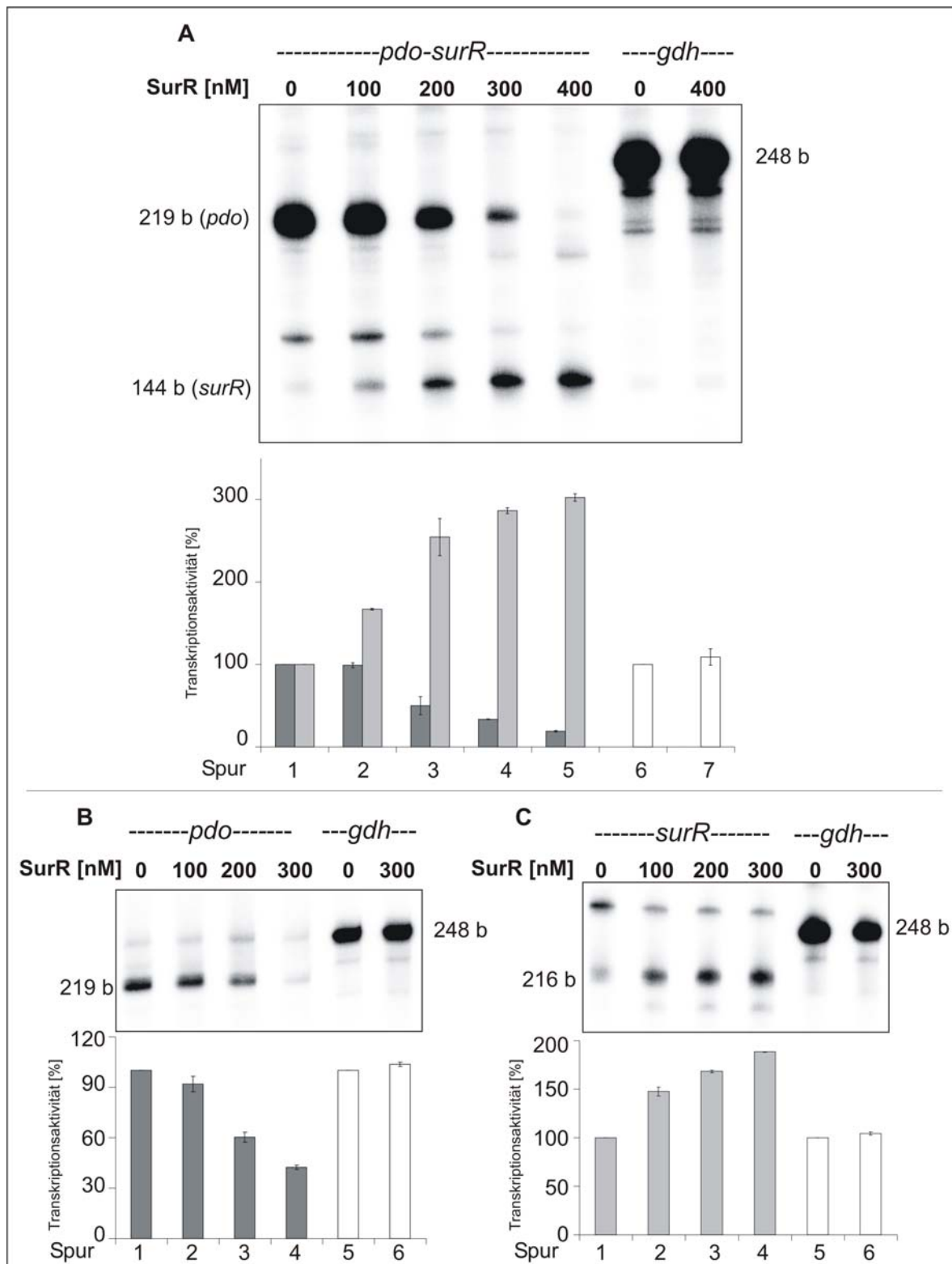


Abb. 19: SurR reguliert die Transkription des Gens *pdo* und seines eigenen Gens *in vitro*.

(A) *In vitro* Transkription der Promotoren der Gene *surR* und *pdo* von einer gemeinsamen Matrize. (B) *In vitro* Transkription des *pdo*-Promotors. (C) *In vitro* Transkription des *surR*-Promotors. Die unterschiedlichen Mengen von SurR sind über den Gelen angezeigt. Die Konzentrationen der Matrizen waren 25 nM *pdo*, 25 nM *surR*, 25 nM *pdo-surR* und 10 nM *gdh*. Die RNA-Produkte wurden in 8%igen PA-Harnstoffgelen untersucht und mit einem Phosphoimager quantifiziert. Die Reaktionen in Abwesenheit von SurR entsprechen 100%. Die Transkriptionsaktivität bei *pdo* ist durch dunkle Balken, von *surR* durch helle Balken und von *gdh* durch weiße Balken im Diagramm dargestellt.

2.3 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der von SurR regulierten Gene

Da SurR die Transkription sowohl als Aktivator wie auch als Repressor beeinflusst, sollten mögliche Zusammenhänge zwischen der Lage von Transkriptionsstart, der Bindestelle von SurR und der TATA-Box aufgezeigt werden. Dazu wurden die Transkriptionsstartpunkte der fünf bereits untersuchten und von SurR regulierten Gene bestimmt.

Hierfür wurde *in vitro* transkribierte RNA durch Primer Extension-Experimente analysiert. Anhand von Sequenzstandarts, in die das gleiche, markierte Oligonukleotid wie in die Primer Extension-Analysen eingesetzt wurde, konnte das jeweilige Startnukleotid abgelesen werden (Abb. 20).

Für *mbh1*, *hydB1*, *nsr* und *pdo* wurde ein Guaninrest als Transkriptionsstartpunkt bestimmt. Bei *surR* handelt es sich um einen Thyminrest.

Bei *mbh1* beginnt die Transkription an Position -61, bei *hydB1* an -73, bei *nsr* an -10, bei *pdo* an -71 und bei *surR* an -16. Die Angaben sind relativ zum Translationsstart des jeweiligen Gens.

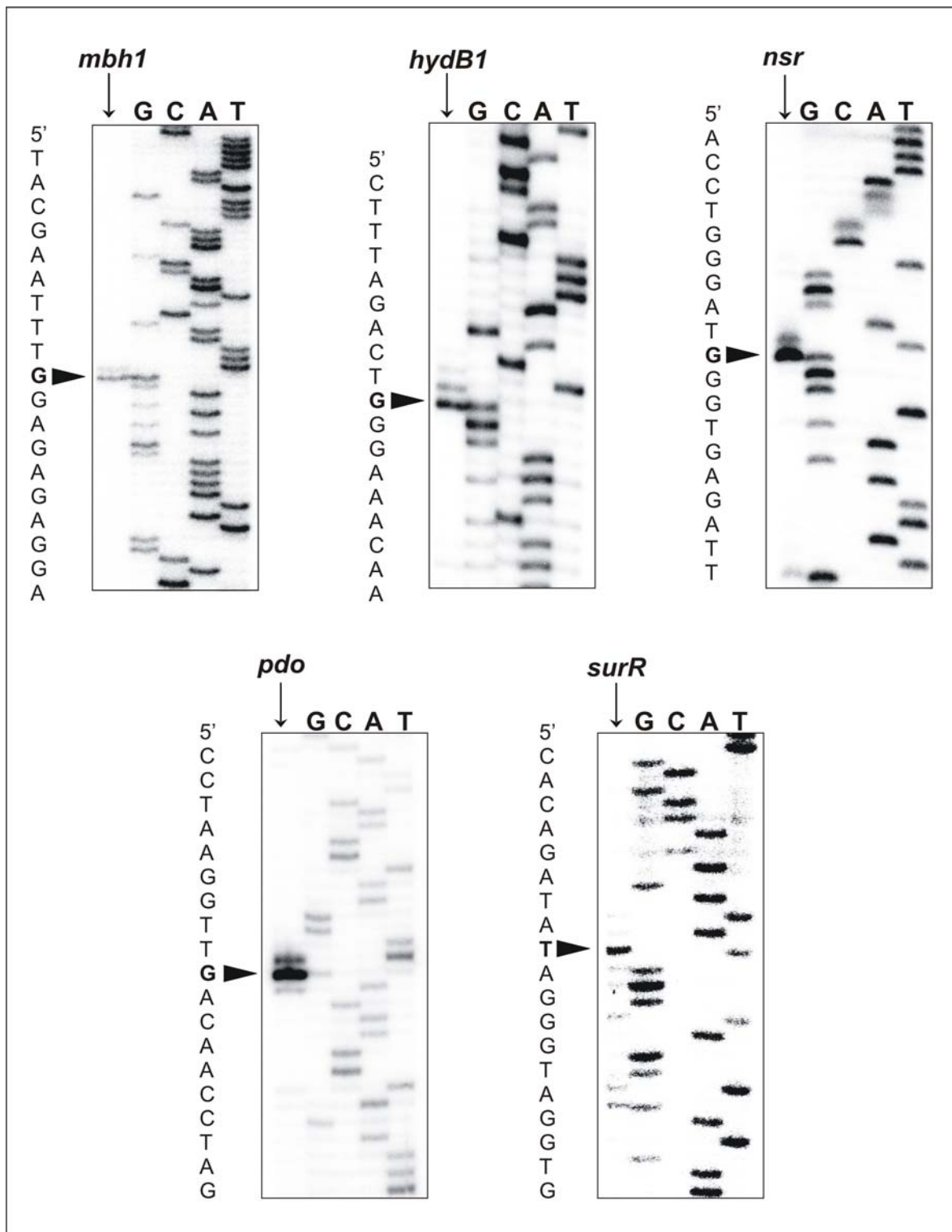


Abb. 20: Primer Extension-Experimente zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene *mbh1*, *hydB1*, *nsr*, *pdo* und *surR*

In vitro Transkriptionsprodukte wurden durch Primer Extension-Experimente analysiert. Die Primer Extension-Produkte sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die mit G, C, A und T gekennzeichneten Spuren zeigen die Sequenzreaktionen, in die die gleichen Oligonukleotide wie auch in die Primer Extension-Reaktionen eingesetzt wurden. Die Sequenzen des codogenen Stranges sind jeweils links neben den Autoradiogrammen dargestellt. Die Startnukleotide sind durch fette Buchstaben gekennzeichnet.

2.4 Die Aktivität von SurR wird durch zwei redox-aktive SH-Gruppen beeinflusst

Die N-terminale DNA-Binde-Domäne von SurR enthält eine Disulfidbindung zwischen zwei eng nebeneinander liegenden Cysteinen. EMSA und Footprint-Analysen bestätigten die Hypothese, dass die Ausbildung einer Disulfidbindung in diesem CxxC-Motiv Auswirkungen auf die Konformation und damit auch auf die Bindeaktivität von SurR hat. Dabei wurde festgestellt, dass nur SurR mit einem reduzierten CxxC-Motiv an die DNA bindet und das Protein durch Oxidation die Bindeaktivität verliert. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass elementarer Schwefel als Oxidationsmittel fungieren könnte. Verstärkt wurde diese Hypothese durch DNaseI-Footprint-Experimente in die Polysulfidlösung eingesetzt wurde.

Diese Befunde sollten durch Analysen im *in vitro* Transkriptionssystem erhärtet werden. Dafür wurde SurR und die SurR Mutante AxxA-SurR, welche als Kontrolle diente, in das *in vitro* Transkriptionssystem eingesetzt. Bei der Mutante wurden die beiden Cysteine durch zwei Alanine ersetzt. Eine Oxidation, die zur Ausbildung einer Disulfidbrücke führt und die damit verbundene Konformationsänderung, war somit nicht mehr möglich.

Die Transkriptionen wurden unter reduzierten Bedingungen ohne Polysulfidlösung und unter oxidierenden Bedingungen mit 1 mM Polysulfidlösung durchgeführt. Dabei wurde die Regulation der Transkription der Gene *hydBI*, *nsr*, *pdo* und *surR* analysiert. Die Gene *pdo* und *surR* wurden wie in Abschnitt 2.2 erklärt zusammen von einer Matrize transkribiert.

Die Transkriptionsexperimente ohne Polysulfidlösung dienten dazu, die Aktivität von SurR und AxxA-SurR zu vergleichen. Dabei wurde von beiden Proteinen die gleiche Menge eingesetzt. Wie dieser Vergleich der Transkriptionsreaktionen mit SurR (Spuren 1-4) und den Transkriptionsreaktionen der Mutante (Spuren 5-8) zeigt, haben beide Proteine den gleichen regulatorischen Effekt (Abb. 21A, B und Abb. 22A, grau SurR, blau AxxA-SurR). Ohne Polysulfidlösung aktivierten sie die Transkription von *hydBI* um etwas mehr als das Dreifache (Abb. 21A). Bei der *in vitro* Transkription von *nsr* reduzierten beide Proteine die Transkriptionsaktivität auf ungefähr 15% (Abb. 21B). Auch bei der Regulation der Gene *pdo* und *surR* war kein Unterschied zu erkennen. Die Transkriptionsaktivität von *pdo* wurde von SurR und AxxA-SurR auf ca. 20% gehemmt (Abb. 22A), wobei die Transkription des *surR*-Gens um mehr das Dreifache aktiviert wurde (Abb. 22A).

In den Experimenten mit 1 mM Polysulfidlösung hatte SurR keinen regulatorischen Einfluss mehr auf die Transkription. Es erfolgte keine Aktivierung von *hydBI* (Abb. 21C), keine Hemmung bei *nsr* (Abb. 21D), keine Hemmung bei *pdo* (Abb. 22B) und auch keine Aktivierung des *surR* Gens (Abb. 22B). AxxA-SurR konnte noch an die DNA binden und regulierte die Transkription. Die Transkriptionsaktivität von *hydBI* stieg auf 175% (Abb. 21C). Die Transkription des *nsr*-Gens wurde auf 12% gehemmt (Abb. 21D). Bei *pdo* sank die Transkriptionsaktivität durch SurR auf 11% (Abb. 22B) und die Transkription von *surR* wurde auf das Doppelte aktiviert (Abb. 22B).

Wie in den Experimenten zuvor wurden Kontrolltranskriptionen mit der *gdh*-Matrize durchgeführt. Abb. 22C zeigt, dass unterschiedliche Konzentrationen von SurR und AxxA-SurR keinen Einfluss auf die Transkription hatten.

Die *in vitro* Transkriptionen, in die Polysulfidlösung eingesetzt wurde, wiesen insgesamt eine schwächere Transkriptionsaktivität auf. Da die Polysulfidlösung das *in vitro* Transkriptionssystem leicht störte, war die Transkriptionsaktivität unter dieser Bedingung insgesamt geringer als ohne Polysulfidlösung. Elementarer Schwefel ist nicht wasserlöslich, weshalb Polysulfidlösung in die Transkriptionen eingesetzt wurde.

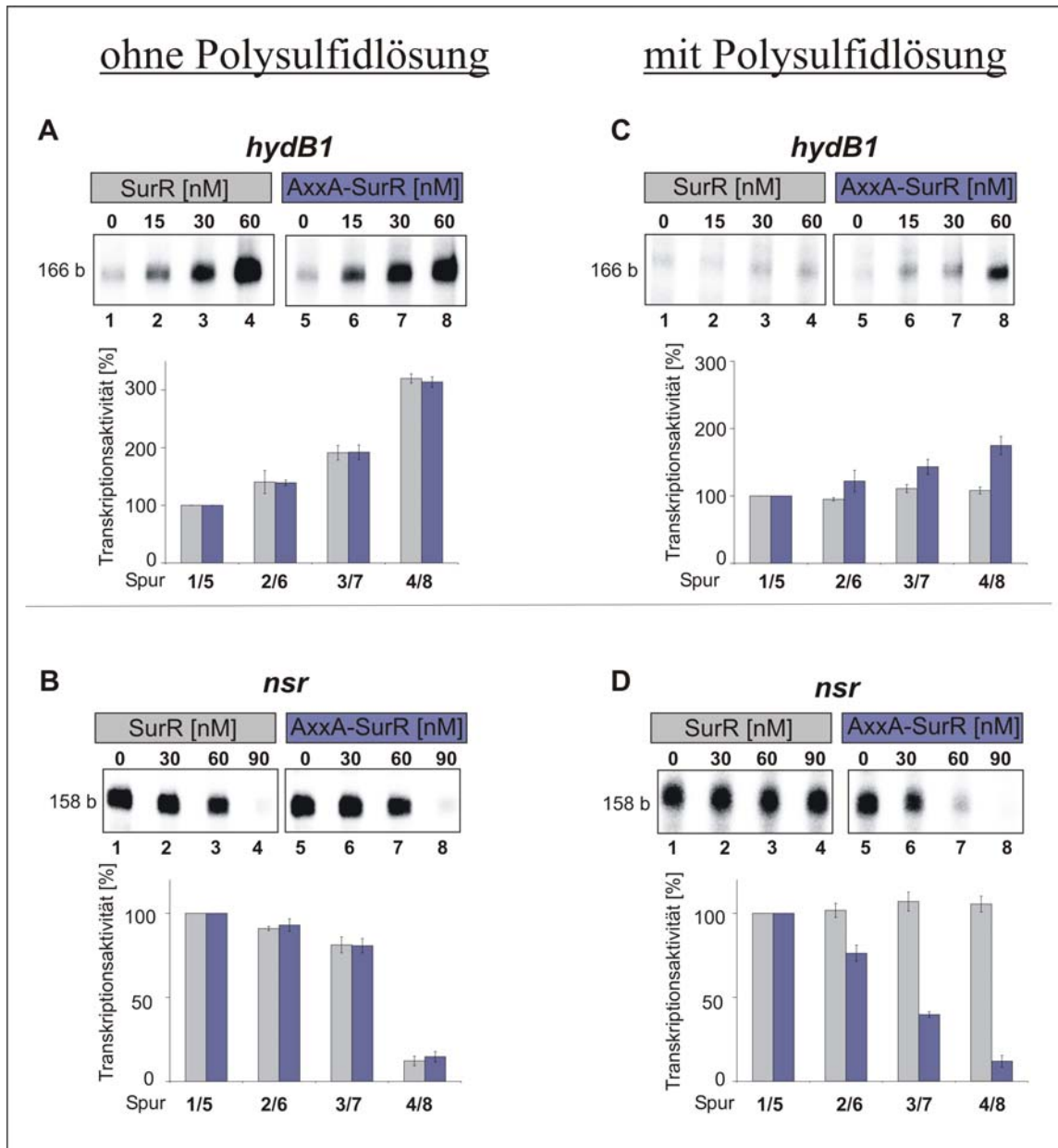


Abb. 21: Polysulfidolösung bewirkt Oxidation des CxxC-Motivs von SurR in *in vitro* Transkriptionen

In vitro Transkriptionen des *hydB1*-Promotors wurden mit und ohne Polysulfidolösung durchgeführt (A, C). Die Transkription des *nsr*-Promotors wurde ebenfalls mit und ohne Polysulfidolösung untersucht (B, D). Die eingesetzten Konzentrationen von SurR und AxxA-SurR sind über den Gelen angegeben. Es wurden 18 nM *hydB1*- und 7 nM *nsr*-Matrize eingesetzt. Die Transkriptionen wurden in einem 8% PA-Harnstoffgel analysiert. Die Quantifizierung ist in den Diagrammen dargestellt. Die grauen Balken repräsentieren die Transkriptionsaktivität der Analysen mit SurR und die blauen Balken die Analysen mit AxxA-SurR.

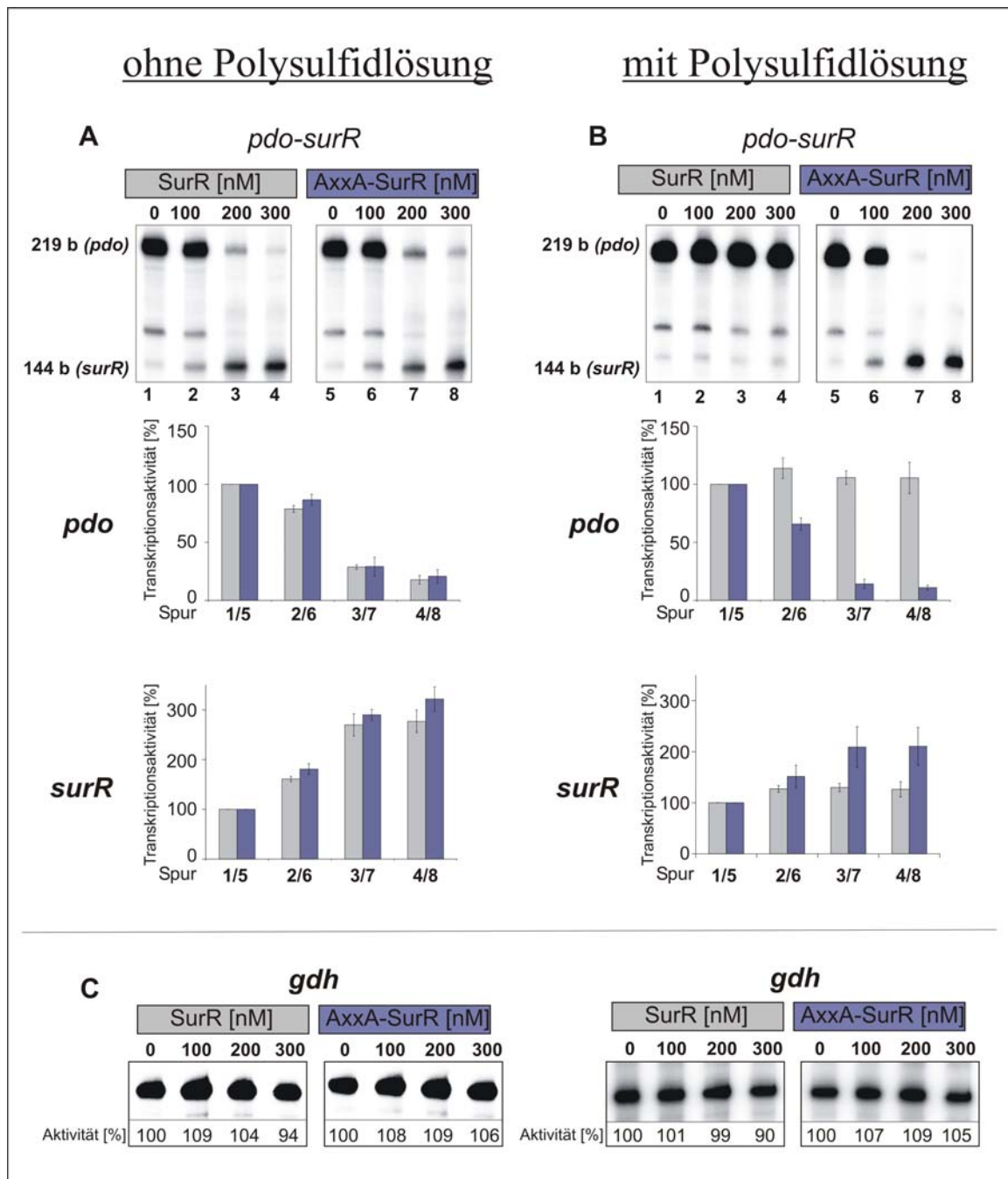


Abb. 22: *In vitro* Transkriptionen zur Analyse des Einflusses der Disulfidbrücke

In vitro Transkriptionen vom *surR-pdo*-Promotors wurden mit (A) und ohne (B) Polysulfidlösung durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen von SurR und AxxA-SurR sind über den Gelen angegeben. Es wurden 16 nM *surR-pdo* und 10 nM *gdh*-Matrize eingesetzt. Die Transkriptionen wurden in einem 8% PA-Harnstoffgel analysiert. Die Quantifizierung ist in den Diagrammen dargestellt. Die grauen Balken repräsentieren die Transkriptionsaktivität der Analysen mit SurR und die blauen Balken die Analysen mit AxxA-SurR. (C) Die Transkription des *gdh* diente als Kontrolle und wurde wie erwartet nicht reguliert.

V Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein ROMA-System für *Pyrococcus furiosus* entwickelt. Durch die Kombination von genomischer *in vitro* Transkription und Microarray-Analyse war es möglich, zwei Transkriptionsprofile miteinander zu vergleichen und potentielle Zielgene eines Regulators zu bestimmen. Es gelang sechs weitere Gene, welche von dem Hitzeschockregulator Phr gehemmt werden, zu identifizieren.

Aufgrund der neu gewonnenen Daten konnten nicht nur neue Erkenntnisse über das Regulon von Phr gewonnen werden, sondern auch die Erkennungssequenz des Regulators genauer definiert werden. Dieses Motiv wurde in eine Genomanalyse eingesetzt, welche die Befunde des ROMA-Experiments bestätigte.

Der zweite Teil dieser Arbeit umfasst molekularbiologisch-biochemische Untersuchungen über das erst kürzlich entdeckte Protein SurR, welches im Schwefelstoffwechsel von *Pyrococcus furiosus* eine große Rolle spielt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten belegen eindeutig, dass es sich bei SurR um einen Transkriptionsregulator handelt, der die Transkription sowohl als Aktivator wie auch als Repressor beeinflusst.

1. ROMA ermöglicht die Identifikation von sechs neuen Genen, die von Phr reguliert werden

Durch *in vitro* und *in vivo* Experimente konnte bereits nachgewiesen werden, dass Phr die Transkription seines eigenen Gens, sowie die der beiden Gene *hsp20* und *aaa⁺atpase* kontrolliert (Vierke et al., 2003). Um den Transkriptionsregulator genauer zu charakterisieren und damit mehr Informationen über die Hitzeschockantwort von *Pyrococcus furiosus* zu erhalten, sollte das Regulon von Phr bestimmt werden.

Mit dem in dieser Arbeit neu etablierten ROMA-System für *Pyrococcus furiosus* konnten sechs neue Gene, die zum Regulon des Hitzeschockregulators Phr gehören, identifiziert werden. Darunter sind fünf Gene, welche für Proteine codieren, die als hypothetisch annotiert sind und deren Funktion noch unbekannt ist. Dabei handelt es sich um PF0624, PF1042, PF1291, PF1292 und PF1488. Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte jedoch dokumentiert werden, dass sie eine Rolle bei der Hitzeschockantwort von *Pyrococcus furiosus* spielen. Das sechste neue Gen, welches von Phr reguliert wird, ist PF1616, welches für die *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase (*mips*) codiert. Dieses Enzym ist an der Synthese von Di-*myo*-inositol-1,1'(3,3')-phosphat (DIP) beteiligt (Borges et al., 2006; Rodrigues et al., 2007). DIP gehört zu den „organic solutes“. Das sind gelöste, organische Stoffe, welche vermehrt bei osmotischem Stress und Hitzestress in der Zelle synthetisiert werden (Goncalves et al., 2008; Martins et al., 1997; Martins und Santos, 1995). Es wird angenommen, dass sie Proteine stabilisieren und so vor Denaturierung schützen (Goncalves et al., 2008; Scholz et al., 1992).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten dokumentieren, dass Phr die Expression von *mips* kontrolliert, indem es an zwei Motive im Promotor bindet. Die Vermutung, dass MIPS eine Funktion bei der Hitzeschockantwort von *Pyrococcus furiosus* hat, konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente bestätigt werden. Das *mips* während der Hitzeschockantwort verstärkt *in vivo* transkribiert wird, konnte bereits durch Northern Blott-Analyse gezeigt werden (Shockley et al., 2003). Die Hitzeschockantwort von

Pyrococcus furiosus wurde bereits *in vivo* durch Microarray-Analyse untersucht, allerdings wurden dabei nur 201 Gene (~10% des Genoms) berücksichtigt (Shockley et al., 2003). Somit wurden leider die in dieser Arbeit durch ROMA identifizierten Hitzeschockgene nicht untersucht. *Archaeoglobus fulgidus* ist das einzige Archaeon, von dem eine genomweite Analyse der Hitzeschockantwort durchgeführt wurde (Rohlin et al., 2005). Die Proteine, der in dieser Arbeit identifizierten Hitzeschockgene, besitzen jedoch keine Homologen in *Archaeoglobus fulgidus*.

Die Microarray-Daten konnten durch *in vitro* Transkriptionen der einzelnen Gene und durch eine genomweite *in silico* Analyse der Promotoren nach einer Bindestelle von Phr bestätigt werden.

Wie bereits erwähnt, reguliert Phr die Transkription, indem es an den Promotor bindet und die Assoziation der Polymerase verhindert. Es wurden bereits zwei Erkennungssequenzen für Phr vorgeschlagen. Zuerst wurde angenommen, dass für die Bindung von Phr eine Promotorregion mit den Sequenzen TTTA an der Position -10, TGGTAA am Transkriptionsstart und AAAA an Position +10 notwendig ist (Vierke et al., 2003). Später wurde vermutet, dass das Palindrom 5'-TTTnnAnnCnnnnnGnnTnnAAA-3' die Bindung von Phr an die DNA bewirkt (Liu et al., 2007). In diese Untersuchungen konnten aber nur die Gene *hsp20*, *aaa⁺atpase* und *phr* einbezogen werden. Durch die in dieser Arbeit neu identifizierten Gene, welche von Phr reguliert werden, standen mehr Promotorregionen zur Bestimmung der Erkennungssequenz von Phr zur Verfügung. Durch ein Alignment konnte folgende Konsensussequenz für die Bindung von Phr vorgeschlagen werden: 5'-TTTAnnnACnnnnnGTnAnnAAAA-3'. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Sequenzen TTT und GTnA besonders wichtig für die Bindung von Phr sind, da sie ohne Ausnahme in allen Promotorsequenzen der regulierten Gene vorkommen (Abb.13).

Durch die Bestimmung der Bindesequenz von Phr war es möglich, eine genomweite Analyse nach Bindestellen durchzuführen. Die in dieser Arbeit vorgeschlagene Bindesequenz für Phr konnte nur in den Promotorregionen der Gene PF0624, PF1042, PF1488, PF1790 (*phr*), PF1882 (*hsp20*) und PF1883 (*aaa⁺atpase*) nachgewiesen werden (Abb.16A). Dieser Befund wird durch ROMA Experimente und spezifische *in vitro* Transkriptionen bestätigt, in denen die Regulation dieser Gene gezeigt ist (Abb. 10+11).

Es wurden auch abweichende Motive der Bindesequenz in die Genomanalyse eingesetzt, wie sie bei den Genen PF1291, PF1292 und PF1616 vorkommen. Auch hier konnte die Spezifität der Bindestelle bestätigt werden. Zwar kommen die Motive noch an weiteren Stellen im Genom vor, doch ist es aufgrund ihrer Position unwahrscheinlich, dass sie an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Keine von ihnen befindet sich stromabwärts der TATA-Box eines Gens, wie es für die Bindestellen der von Phr regulierten Gene nachgewiesen wurde. So konnten die *in vitro* gewonnenen Daten aus dem ROMA-Experiment *in silico* bestätigt werden.

Zur Bestätigung der durch ROMA gewonnenen Daten, dienten außerdem *in vitro* Transkriptionen, in die PCR-amplifizierte Promotor-DNA des zu untersuchenden Gens als Matrize eingesetzt wurde. Dabei konnte bestätigt werden, dass die im ROMA-Experiment identifizierten Gene von Phr reguliert werden (Abb.11). Außerdem konnte spezifisch für jeden Promotor eines einzelnen Gens ermittelt werden, wie stark Phr seine Transkription hemmt und so ein Vergleich zwischen den von Phr regulierten Genen durchgeführt werden (Abb. 12). Dabei wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme der Transkriptionsaktivität und der Übereinstimmung der Bindesequenz mit der Konsensussequenz entdeckt. Die Transkription des Gens PF1292 wird am schwächsten durch Phr gehemmt. Seine Bindesequenz weicht am stärksten von der Konsensussequenz ab. Starke Abweichungen haben auch die beiden Bindesequenzen von PF1616, so dass es nicht weiter verwunderlich ist, dass dieses Gen ebenfalls nur schwach gehemmt wird, obwohl es zwei Phr-Bindemotive besitzt.

Bei den Genen PF1291 und PF1790 weicht das Bindemotiv um eine Base ab, und auch bei ihnen ist die Hemmung der Transkription schwächer als bei den übrigen Genen, welche eine vollständige Konsensussequenz besitzen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen sich gegenseitig. Die Ergebnisse aus dem ROMA-Experiment konnten durch spezifische *in vitro* Transkriptionen bestätigt werden, und so gelang es, sechs neue von Phr regulierte Gene zu identifizieren. Diese konnten mit den bereits identifizierten Genen in ein Alignment eingesetzt werden, so dass ein neues Bindemotiv für Phr definiert werden konnte. Dieses Bindemotiv spiegelt sich in den spezifischen *in vitro* Transkriptionen wieder. Je stärker die Bindesequenz von der Konsensussequenz abweicht, desto schwächer wurde die Transkription durch Phr gehemmt. Außerdem konnte durch die Analyse des Genoms nach der Bindesequenz wiederum das ROMA-Experiment bestätigt werden. Nur die im Microarray identifizierten Gene weisen eine Phr-Bindestelle stromabwärts der TATA-Box auf.

2. Die Rolle von Phr bei der Hitzeschockantwort

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten dokumentieren, dass Phr die Transkription von neun Genen reguliert. Davon wurden sechs Gene in der vorliegenden Arbeit identifiziert. Die anderen drei Gene waren bereits bekannt (Vierke et al., 2003). Bei diesen handelt es sich um *aaa⁺atpase*, *hsp20* und *phr*. AAA⁺ATPasen (ATPasen associated with a variety of cellular activities) sind bisher in allen Domänen des Lebens nachgewiesen worden und erfüllen viele unterschiedliche Funktionen. So sind sie zum Beispiel an der Faltung und am Abbau von Proteinen beteiligt und spielen bei der DNA-Replikation, der Rekombination und im Zellzyklus eine Rolle. Ihre genaue Funktion bei der Hitzeschockantwort der Archaeen ist allerdings noch unbekannt (Laksanalamai et al., 2004).

Das kleine Hitzeschockprotein Hsp20 wirkt als molekulares Chaperon, indem es Proteine vor Aggregation und Denaturierung schützt (Laksanalamai und Robb, 2004).

Über die Funktion der noch als hypothetisch annotierten Proteine lässt sich aufgrund der Sequenzanalyse nur spekulieren. Das Protein PF0624 besitzt eine Histon-Falte (histone fold) und gehört somit zu den DNA bindenden Proteinen. Interessanterweise wurde von *Sulfolobus solfataricus* das Histone-ähnliche Protein Sso7d beschrieben, von dem angenommen wird, dass es die Topologie der DNA bei Hitzestress beeinflusst (Lopez-Garcia et al., 1998). Es ist möglich, dass das Protein PF0624 ebenfalls eine Rolle bei der Stabilisierung der DNA-Struktur spielt. Eine weitere Funktion des Proteins PF0624 könnte sein, dass es die Transkription verschiedener Gene reguliert, indem es an Promotorregionen bindet und so in Konkurrenz mit den Transkriptionsfaktoren oder der DNA Polymerase tritt (Reeve et al., 2004).

Das Protein PF1042 besitzt eine Ruberythrin-domäne und gehört zur „Ferritin like Superfamily“. Mitglieder dieser Familie haben unterschiedliche Funktionen. Einige schützen die DNA vor Denaturierung.

Das Protein PF1291 besitzt eine ApaH-Domäne wie sie bei Diadenosin-teraphosphatasen vorkommt. Diese sind an Signaltransduktionsmechanismen beteiligt. Außerdem gehört das Protein zur PP2Ac-Superfamilie. Die Mitglieder dieser Familie sind Homologe der eukaryotischen Protein-Phosphatase 2A und gehören zu den Serin/Threonin-Phosphatasen. Sie sind an der Regulation des Zellwachstums und der Zellteilung beteiligt. Wahrscheinlich greift das Protein PF1291 in die Regulation der Hitzeschockantwort ein, indem es durch Dephosphorylierung Reaktionskaskaden initiiert.

PF1292 gehört zur Familie der an der Polysaccharidbiosynthese beteiligten Proteine. Es ist möglich, dass dieses Protein an der Synthese von „organic solutes“ beteiligt ist, die

während des Hitzeschocks gebildet werden, um Proteine zu stabilisieren und vor dem Denaturieren zu schützen.

Über die Funktion des Proteins PF1488 lässt sich leider nicht spekulieren, da es keine bekannte Domäne besitzt und auch keine bekannten homologen Proteine. Die Sequenzanalyse hat ergeben, dass Homologe dieses Proteins fast ausschließlich zu den Euryarchaeota gehören.

Die Funktion des Proteins PF1616, der *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase bei der Synthese von DIP wurde bereits im vorherigen Abschnitt erläutert.

Somit lassen sich fast alle von Phr regulierten Gene mit der Hitzeschockantwort in Verbindung bringen und unterstreichen seine Rolle als Hitzeschockregulator.

3. Vorteile und Grenzen des ROMA-Experiments

Die Transkription ist der erste Schritt zur Proteinsynthese und somit für die Regelung der Expression eines Gens von großer Bedeutung. Wie eingangs erwähnt, wurden bereits viele archaeele Transkriptionsregulatoren entdeckt. Oft konnte nur ihre Funktion als Autoregulator beschrieben werden. Darum ist es von Interesse eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht, das Regulon eines Transkriptionsregulators zu definieren. Damit ist es nicht nur möglich, das Regulatorprotein genauer zu charakterisieren, sondern auch Gene, die an einem bestimmten Vorgang, wie zum Beispiel der Hitzeschockantwort beteiligt sind, zu identifizieren.

ROMA bietet viele Vorteile bei der Untersuchung eines Transkriptionsregulators. Es ist zum Beispiel kein genetisches System nötig. Dieses ist bei vielen Archaeen noch nicht etabliert. Außerdem sind viele Transkriptionsregulatoren essentiell und können nicht einfach aus dem Genom entfernt werden. Ein weiterer Vorteil von ROMA ist, dass der erste Schritt eines Vorgangs beobachtet wird und dieser nicht durch Folgereaktionen, wie zum Beispiel sekundäre Genexpression, verdeckt wird. Bei ROMA handelt es sich um ein *in vitro* Experiment, in welches gereinigte Proteine und DNA eingesetzt werden. Dieses System ist somit frei von negativen Regulatoren und Einflüssen. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich in diesem System Vorgänge analysieren lassen, die *in vivo* nicht vorkommen und sich auch nicht induzieren lassen. So können zum Beispiel Transkriptionsregulatoren untersucht werden, bei denen es nicht möglich ist, ihre Aktivität *in vivo* hervorzurufen oder von denen unbekannt ist, unter welchen Bedingungen sie in einer Zelle vorkommen. Auch lassen sich zum Beispiel zwei Transkriptionsregulatoren gleichzeitig und in Konkurrenz zueinander untersuchen (MacLellan et al., 2009).

Allerdings gibt es auch einige Aspekte, welche bei ROMA-Experimenten berücksichtigt werden müssen. Zum Beispiel ist die *in vitro* synthetisierte RNA nicht mit *in vivo* synthetisierter RNA zu vergleichen. Die Expressionsmuster der Gene können stark voneinander abweichen. Im *in vitro* System kommt es aufgrund von „end to end-“ und „read through-“ Transkriptionen zu unspezifischen RNA Produkten. Dabei beginnt die RNAP an einem Fragmentende anstatt an einem Promotor mit einer Transkription, oder sie bricht die Transkription am Ende eines Gens nicht ab und liest einfach weiter. Um die Menge der dabei entstehenden unspezifischen RNA-Produkte möglichst gering zu halten, ist die Wahl des Restriktionsenzym von großer Bedeutung (MacLellan et al., 2009).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass ROMA-Untersuchungen durch Folgeexperimente abgesichert werden müssen. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse aus der Analyse der genomischen Transkription durch weitere *in vitro* Experimente, in die jedes Gen einzeln

eingesetzt wurde, belegt. Außerdem wurden die Daten durch die Bestimmung des Phr-Bindemotivs und der damit verbundenen Analyse des Genoms bestätigt. ROMA-Daten weisen aufgrund unspezifischer Transkriptionen oft einige falsche Positive auf. In dieser Arbeit wurden alle Gene, die eine Phr-Bindestelle aufwiesen, in weitere Experimente eingesetzt. Dabei konnte bewiesen werden, dass sie zum Regulon von Phr gehören.

4. SurR beeinflusst die *in vitro* Transkription als Aktivator und als Repressor

In dieser Arbeit konnte die Rolle von SurR als Aktivator und auch als Repressor durch *in vitro* Transkriptionsexperimente nachgewiesen werden. So aktiviert SurR zwei der im Microarray negativ regulierten Gene (Schut et al., 2007). Der Regulator aktiviert eindeutig die Transkription der Gene *mbh* und *hydB1* (Abb. 17A+B).

Durch DNaseI-Footprints konnten zwei Bindestellen von SurR in der Promotorregion von *mbh1* festgestellt werden. Eine große befindet sich stromaufwärts der TATA-Box, und eine kleinere befindet sich stromabwärts des Transkriptionsstarts (Lipscomb et al., 2009). Vermutlich aktiviert SurR die Transkription dieses Gens, indem es die Bindung von TBP oder TFB an den Promotor unterstützt. Die zweite Bindestelle zwischen dem Transkriptions- und dem Translationsstart könnte dazu dienen, die DNA zu biegen und so die Assoziation des Transkriptionsapparates an den Promotor zu begünstigen. Interessanterweise aktiviert Ptr2, ein Regulator von *M. jannaschii*, die *in vitro* Transkription, indem es auch an zwei Stellen des *rb2* Promotors bindet. Ptr2 aktiviert, wie auch für SurR vermutet, die Transkription, indem es die Assoziation von TBP begünstigt (Ouhammouch et al., 2003). SurR bindet zuerst an die stromaufwärts gelegene Bindestelle und später an die stromabwärts gelegene (Lipscomb et al., 2009). Ein weiterer möglicher Regulationsmechanismus könnte somit sein, dass SurR die Transkription aktiviert, indem es an das erste Motiv bindet und erst bei einer höheren Konzentration auch an das zweite Motiv. Dadurch könnte es dann die Transkription hemmen (Abb. 24A).

Im Gegensatz zum Promotor von *mbh1* besitzt der Promotor von *hydB1* nur eine SurR-Bindestelle. Diese befindet sich stromaufwärts der TATA-Box (Lipscomb et al., 2009). Aufgrund dieser Position ist stark anzunehmen, dass SurR die Transkription dieses Gens ebenfalls durch die Rekrutierung von TBP oder TFB aktiviert (Abb. 24B).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass SurR die *in vitro* Transkription der Gene *nsr* und *pdo* hemmt (Abb. 17C und 19B). Der Footprint am Promotor von *nsr* überdeckt eindeutig das BRE/TATA- Element und den Transkriptionsstart (Lipscomb et al., 2009). Diese Daten deuten darauf hin, dass SurR die Transkription von *nsr* hemmt, indem es die Bindung der gesamten Transkriptionsmaschinerie verhindert. Weder die Transkriptionsfaktoren noch die RNAP können an die Promotorregion binden (Abb. 24E).

Die beiden Gene *pdo* und *surR* liegen im Genom hintereinander und werden jeweils in die entgegengesetzte Richtung transkribiert (Abb. 23). Dabei scheint nur *pdo* eine TATA-Box zu besitzen. Zwischen den Translationsstartpunkten der beiden Gene befindet sich eine 132 bp lange Region. Die TATA-Box befindet sich näher am Transkriptionsstart von *surR*, während sich der Footprint des Regulators mehr auf der Seite von *pdo* befindet (Lipscomb et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass SurR die Transkription von *pdo* hemmt, während es die Transkription seines eigenen Gens aktiviert (Abb. 19). Wahrscheinlich hemmt SurR die Assoziation der RNAP an den Promotor von *pdo*, indem es den Transkriptionsstart dieses Gens bedeckt, während es die Bindung der Transkriptionsfaktoren oder der RNAP an den Transkriptionsstart von *surR* unterstützt und

so die Transkription seines eigenen Gens aktiviert. Eine Sequenzanalyse der Promotorregion ist in Abbildung 23 dargestellt. Sie zeigt die Promotorregion der beiden Gene *pdo* und *surR*.

Dass SurR die Transkription seines eigenen Gens aktiviert ist ungewöhnlich. Meistens wirken Transkriptionsregulatoren negativ auf die Expression ihres eigenen Gens. Es ist möglich, dass hier die Konzentration von SurR als Kontrollmechanismus dient. Es wurde bereits spekuliert, dass die Bindung eines SurR-Proteins an eine spezifische Sequenz die Bindung weiterer SurR-Proteine begünstigt. So könnte die Transkription durch die Bindung von einem SurR aktiviert werden. Dadurch steigt die Konzentration an SurR-Protein. Es bindet mehr SurR an den *surR*-Promotor und die Transkription wird dadurch gehemmt.

Das SurR die Transkription seines eigenen Gens aktiviert, konnte nur durch *in vitro* Studien nachgewiesen werden. Microarray-Daten des Schwefelstoffwechsels von *Pyrococcus furiosus* erbrachten zu keinem Zeitpunkt einen Hinweis auf eine Änderung der Expression des *surR* Gens *in vivo*. Wahrscheinlich unterliegt die Regulation dieses Gens *in vivo* einem komplexeren Mechanismus als *in vitro*.

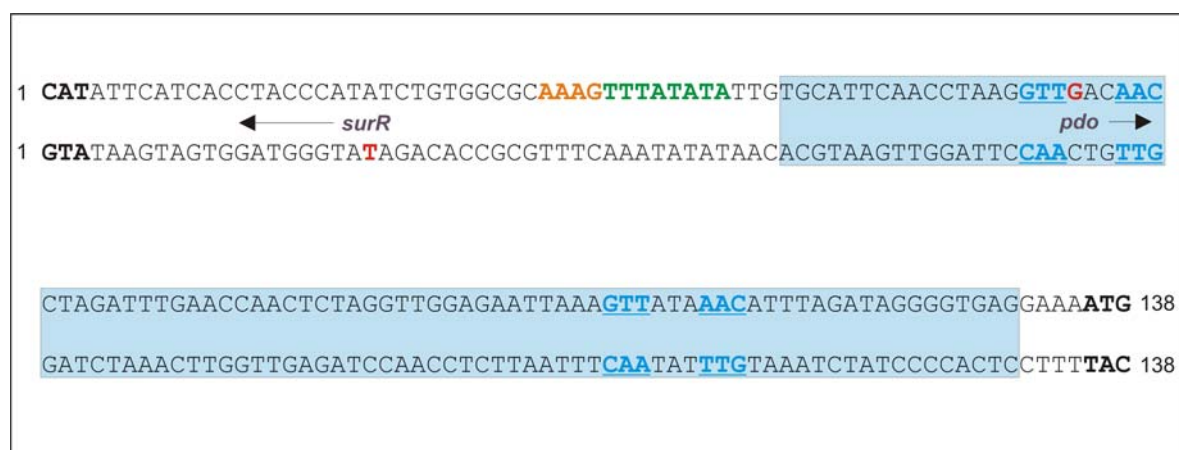


Abb. 23: SurR hemmt die Transkription von *pdo* während es die Transkription von *surR* aktiviert

Sequenz der Promotorregion der Gene *surR* und *pdo*. Die unterschiedlichen Komponenten sind durch fette, farbige Buchstaben markiert. Die TATA-Box ist grün, das BRE orange, die jeweiligen Transkriptionsstarts rot und das SurR Bindemotiv blau gekennzeichnet. Der Translationsstart ist durch fette, schwarze Buchstaben gekennzeichnet. Die Footprint-Region von SurR ist hellblau unterlegt. Wahrscheinlich hemmt SurR die Transkription von *pdo*, indem es den Transkriptionsstart überlagert und die Assoziation der RNAP an den Promotor verhindert. Gleichzeitig aktiviert es die Transkription von *surR*, indem es die Assoziation der Transkriptionsfaktoren oder der Polymerase an den Promotor unterstützt.

In Abbildung 24 sind die Daten aus den DNaseI-Footprint-Analysen, *in vitro* Transkriptionen und Primer Extension-Experimenten zur Transkriptionsstartbestimmung zusammengefasst. Kombiniert man sie, so lässt sich daraus ein möglicher Regulationsmechanismus von SurR herleiten.

In allen drei Fällen, bei denen eine Aktivierung durch SurR vorliegt, bindet der Regulator vor der TATA-Box. Dies unterstützt die Hypothese, dass SurR die Transkription aktiviert, indem es die Assoziation von TBP oder TFB unterstützt. Dieser Mechanismus könnte bei der Aktivierung der Gene *mbh1*, *hydB1* und *surR* vorliegen (Abb. 24A, B, C).

Bindet SurR hinter der TATA-Box und bedeckt den Transkriptionsstart, hemmt es die Transkription. Dies ist bei *pdo* und *nsr* zu beobachten (Abb. 24D, E). Wahrscheinlich verhindert dabei SurR die Assoziation der RNA Polymerase, wie es schon für die Transkriptionsregulatoren Phr und LrpA beschrieben worden ist.

Diese Hypothese zum Regulationsmechanismus von SurR muss allerdings noch durch Footprint-Experimente belegt werden, in welche SurR, RNAP und die beiden Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden.

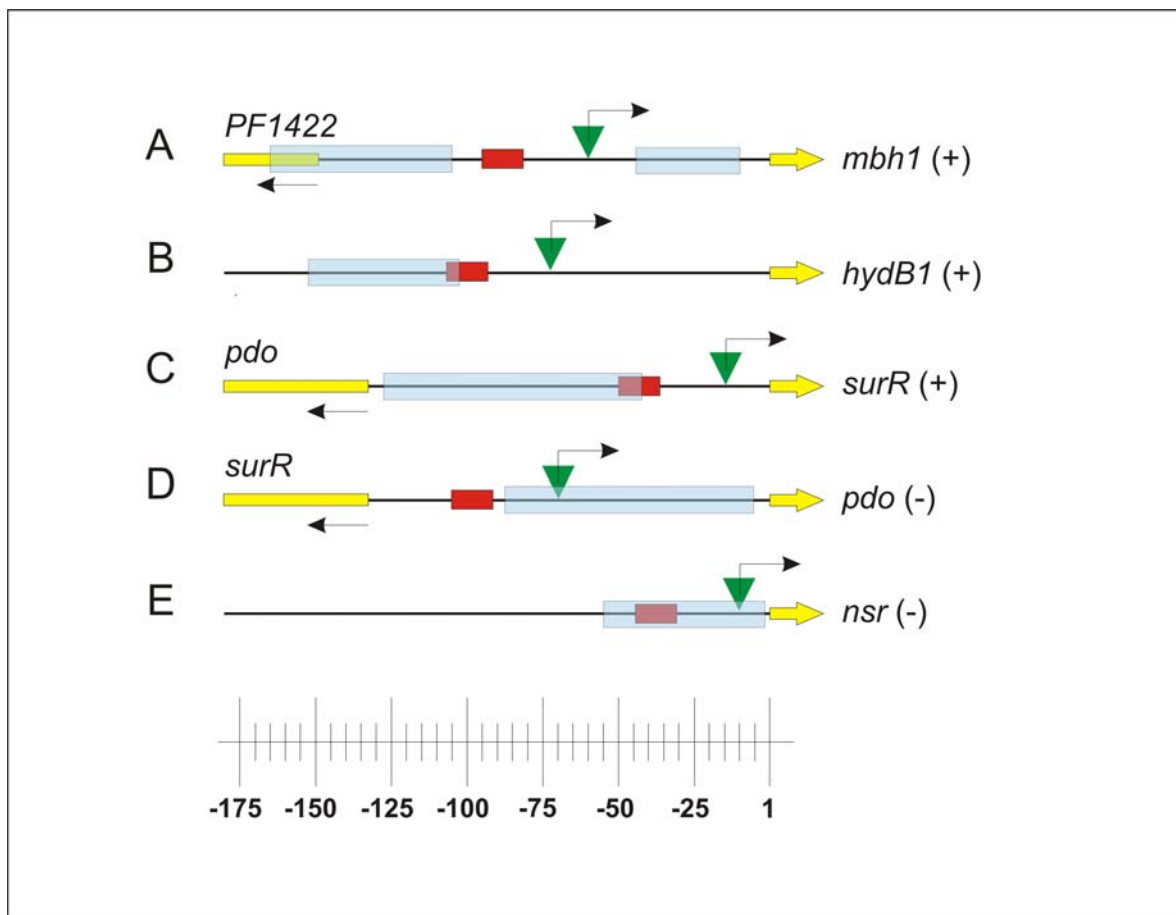


Abb. 24: Die Kombination der Daten aus DNaseI-Footprint-Analyse, *in vitro* Transkription und Transkriptionsstartbestimmung lässt auf den Regulationsmechanismus von SurR schließen (verändert nach Lipscomb et al., 2009)

Schematische Darstellung der Promotorregion der Gene *mbh1*, *hydB1*, *surR*, *pdo* und *nsr*.

Die BRE/TATA-Box-Region ist als rotes Rechteck, der Transkriptionsstart als grünes Dreieck, die ORFs als gelbe Pfeile und Rechtecke und die Footprint-Regionen als hellblaue Rechtecke dargestellt. Die Transkriptionsrichtung ist durch schwarze Pfeile angegeben. Die Promotorregionen sind relativ zum Translationsstart des von SurR regulierten Gens dargestellt (gelbe Pfeile). Die Aktivierung der Transkription eines Gens durch SurR ist durch ein (+), die Hemmung durch ein (-) gekennzeichnet. Bindet SurR stromaufwärts der TATA-Box, aktiviert es die Transkription. Bindet es stromabwärts der TATA-Box, überlappt es den Transkriptionsstart und hemmt die Transkription. Bei *mbh* bindet SurR zuerst an die stromaufwärts der TATA-Box gelegene Bindestelle und aktiviert die Transkription. Die Funktion der zweiten Bindestelle ist noch unklar. Die Transkription von PF1422 wird von SurR nicht beeinflusst.

5. Die Bindeaktivität von SurR wird durch einen Redoxschalter beeinflusst

Die durch *in vitro* Transkriptionsanalysen bestätigte Funktion von SurR als Aktivator und Repressor bestimmter Gene steht im Gegensatz zu den Microarray-Analysen des Schwefelstoffwechsels von *Pyrococcus furiosus*. Die im Microarray durch Anwesenheit von Schwefel negativ regulierten Gene, werden von SurR *in vitro* aktiviert, und Gene deren Expression im Microarray zunimmt, werden von dem Regulator *in vitro* gehemmt.

Dieses Paradoxon konnte jedoch durch die Strukturanalyse von SurR erklärt werden (Lipscomb, 2007). Wie bereits erwähnt, besitzt SurR ein CxxC-Motiv, welches als Redoxschalter die Bindeaktivität von SurR beeinflusst. Unter aeroben Bedingungen wird dieses Motiv oxidiert und bildet Schwefeldisulfidbrücken aus. Dies führt zu einer Konformationsänderung, und SurR verliert seine Bindeaffinität an die DNA. Da die Microarray-Analysen ergaben, dass sich die Expression einiger Gene nach der Zugabe von elementarem Schwefel ändert, stand die Vermutung nahe, dass dieser als Oxidationsmittel für SurR dienen könnte.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten unterstützen diesen Befund. *In vitro* Transkriptionen, in welche SurR eingesetzt wurde, zeigen, dass bei der Zugabe von Polysulfidlösung, SurR die Transkription nicht mehr reguliert (Abb. 21, 22). Dabei wurden unterschiedliche Promotoren eingesetzt, welche von SurR sowohl aktiviert wie auch gehemmt werden. Als Kontrolle wurde die in der Einleitung schon beschriebene Mutante AxxA-SurR eingesetzt. Durch den Aminosäureaustausch besitzt dieses Protein keinen Redoxswitch und liegt immer in der Konformation vor, welche an die DNA bindet. AxxA-SurR wurde zur Kontrolle in die Transkriptionen eingesetzt. Damit sollte belegt werden, dass das CxxC-Motiv für die Bindeaktivität von SurR verantwortlich ist und nachgewiesen werden, dass die Polysulfidlösung das *in vitro* System nicht blockiert.

Durch die gewonnenen Daten lassen sich die unterschiedlichen Beobachtungen im Microarray und der *in vitro* Transkription erklären. Im Transkriptionssystem befindet sich SurR im reduzierten Zustand und bindet an den Promotor der von ihm regulierten Gene. Deren Expression wird daraufhin aktiviert oder gehemmt. In der Microarray-Analyse wurde die Reaktion von SurR auf Schwefel beobachtet. Dieser bewirkt, dass SurR in der oxidierten Form vorliegt und folglich nicht mehr an die DNA binden kann. Die Expression der zuvor aktivierten Gene nimmt ab, und zuvor gehemmte Gene werden transkribiert (Abb. 25).

Darüber wie die Polysulfidlösung die Oxidation des CxxC-Motivs bewirkt, lässt sich nur spekulieren. Bei Temperaturen über 80°C wird Schwefel spontan zu Polysulfid reduziert (Belkin et al., 1985; Kamyshny et al., 2007). Polysulfid ist nur bei einem hohen pH stabil und dissoziiert durch den neutralen pH des Kulturmediums oder des Puffers im *in vitro* Transkriptionssystem. Darum liegt der kolloidale Schwefel in Form von S₈-Ringen vor. (Kleinjan et al., 2005). Diese Verbindung könnte für die Oxidation von SurR verantwortlich sein (Lipscomb, 2007).

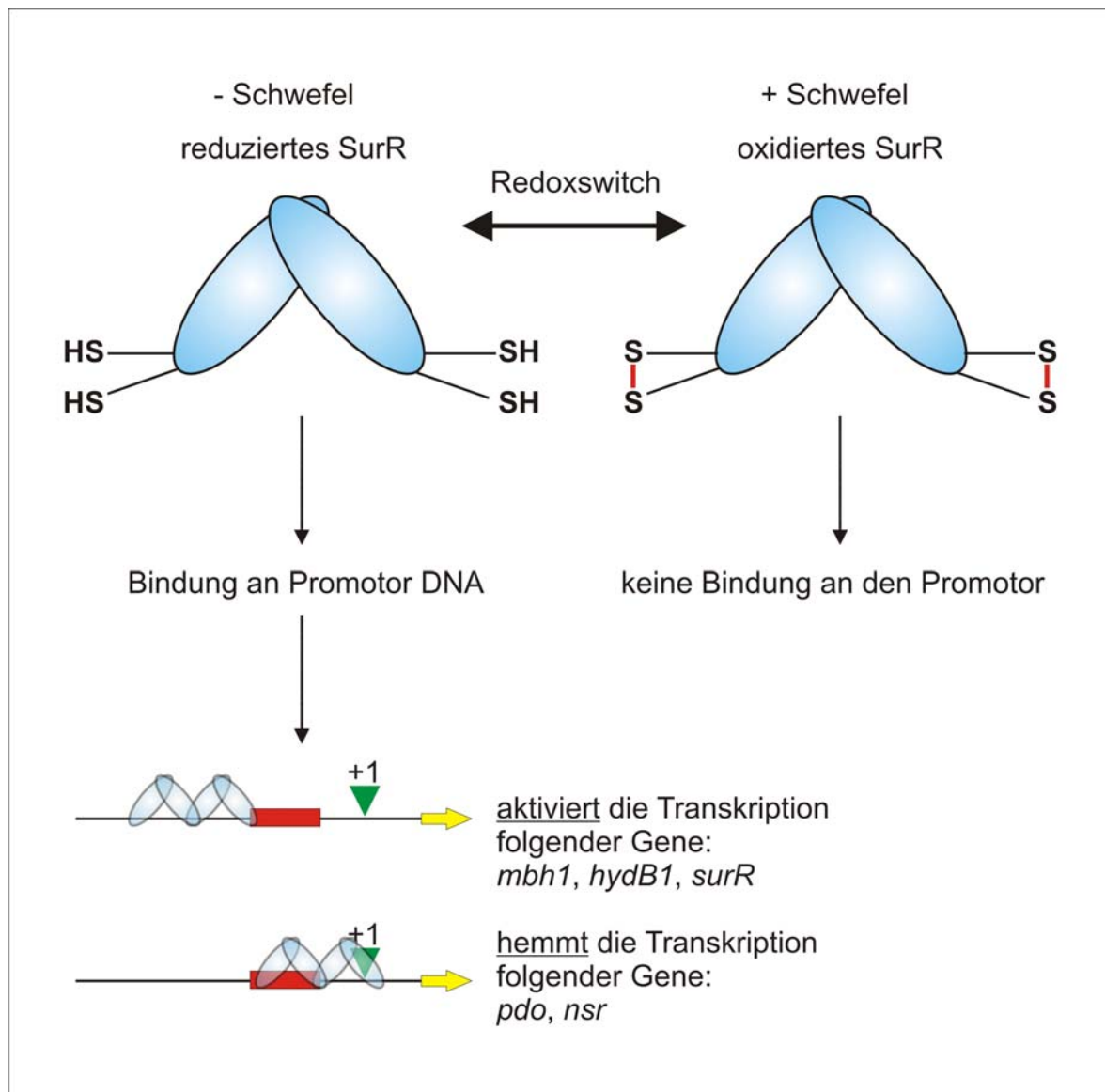


Abb. 25: Die Bindeaktivität von SurR wird durch einen Redoxschalter beeinflusst (verändert nach Lipscomb, 2007)

Schematische Darstellung der Regulation der Bindeaffinität von SurR durch das CxxC-Motiv.

Ist kein Schwefel vorhanden, liegen die beiden Cysteine reduziert vor, und SurR kann an die Promotor DNA binden und die Gene regulieren. Durch die Zugabe von Schwefel wird das CxxC-Motiv oxidiert, und die Cysteine bilden Schwefelwasserstoffbrücken aus. SurR kann nicht mehr an Promotoren binden.

6. Die Rolle von SurR im Stoffwechsel von *Pyrococcus furiosus*

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten belegen, dass SurR die Transkription von *pdo* hemmt. Dieses Gen kodiert für die Protein-Disulfid-Oxidoreduktase (PDO). PDO besitzt zwei Thioredoxin-Domänen mit zwei redoxaktiven Cystein-Resten. Das Protein kann sowohl Disulfidbrücken reduzieren, als auch Dithiole oxidieren (Pedone et al., 2004; Ren et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass PDO den Redoxzustand von SurR beeinflusst. Dieser Befund zusammen mit dem Ergebnis, dass SurR die Expression von *pdo* reguliert, lässt vermuten, dass hier ein Rückkopplungsmechanismus zur Kontrolle von SurR vorliegt (Lipscomb, 2007). Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen des bakteriellen

OxyR. Dieses reguliert das Gen für ein Glutarredoxin. Dieses kleine Redoxenzym reduziert wiederum OxyR (Zheng und Storz, 2000).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die *in vitro* Transkription von *nsr* unter der Kontrolle von SurR steht. Interessanterweise codiert dieses Gen für die NAD(P)H-Schwefelreduktase. Dieses Enzym reduziert kolloidalen Schwefel unter NAD(P)H und CoA Verbrauch zu Sulfid (Schut et al., 2007). Diese Befunde lassen auf einen Regulationsmechanismus zwischen SurR und NSR schließen. Ist kolloidaler Schwefel vorhanden, bewirkt dieser die Oxidation des CxxC-Motivs von SurR. Damit verliert SurR seine Bindeaktivität und kann nicht mehr an den Promotor des *nsr*-Gens binden und seine Expression hemmen. Dieses Gen wird daraufhin transkribiert, und NSR bewirkt die Reduktion des Schwefels zu H_2S (Lipscomb, 2007).

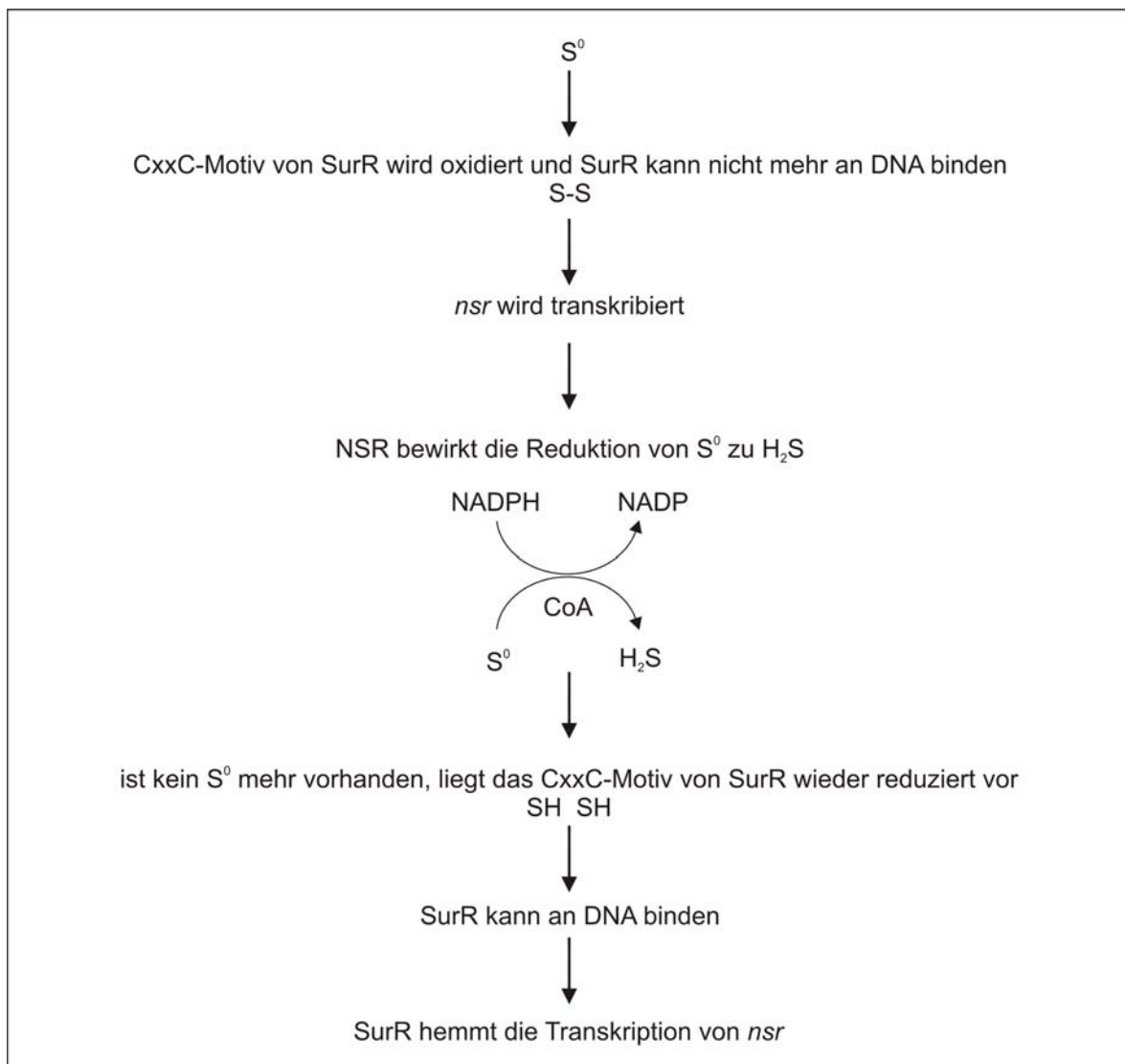


Abb. 26: Regulationsmechanismus zwischen SurR und *nsr*

SurR reguliert die Transkription von *nsr*, während *nsr* durch die Reduktion von elementarem Schwefel die Bindeaffinität von SurR beeinflusst.

VI Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung und Charakterisierung zweier Transkriptionsregulatoren von *Pyrococcus furiosus*. Dabei handelt es sich um den Hitzeschockregulator Phr und den Regulator des Schwefelstoffwechsels SurR.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein ROMA (run-off transcription-microarray analysis)-System für *Pyrococcus furiosus* entwickelt. Mit der Kombination aus *in vitro* Transkription und Microarray-Analyse konnte das Regulon des Transkriptionsregulators Phr bestimmt werden. Dabei konnte Phr genauer charakterisiert und seine Rolle bei der Regulation der Hitzeschockantwort definiert werden.

Um die Regulation aller Gene im Genom zu untersuchen, wurde ein *in vitro* System entwickelt, mit dem es möglich war, mit *Sma*I gespaltene chromosomale DNA von *Pyrococcus furiosus* zu transkribieren. Die genomischen Transkriptionen wurden mit und ohne Phr durchgeführt. Der Vergleich einer basalen und einer regulierten Transkription erfolgte durch Microarray-Analysen, welche in Kooperation mit Dr. Gerrit Schut (University of Georgia, Athens) durchgeführt wurden. Dafür wurde die *in vitro* synthetisierte RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit einem Microarray hybridisiert. Mit diesem ROMA-System für *Pyrococcus furiosus* konnten sechs neue Gene, welche zum Regulon von Phr gehören, identifiziert werden. Dabei handelt es sich um: PF0624, PF1042, PF1291, PF1292, PF1488 und PF1616. Ihre Promotorregion wurde in standard *in vitro* Transkriptionen eingesetzt und so die Regulation durch Phr für jedes Gen einzeln nachgewiesen.

Des Weiteren konnte durch ein Alignment der Promotorregionen dieser Gene das Erkennungsmotiv von Phr genauer definiert werden. Dabei wurde die Sequenz '5-TTTAnnnACnnnnnGTnAnnAAA-3' identifiziert. Diese wurde in eine *in silico* Genomanalyse eingesetzt, welche ergab, dass nur die von Phr regulierten Gene das Phr-Bindemotiv im Promotorbereich besitzen.

Fünf der neuen von Phr regulierten Gene sind als hypothetische Proteine annotiert. Aufgrund von Sequenzanalysen konnte über ihre genaue Funktion nur spekuliert werden. Die vorliegende Arbeit hat jedoch gezeigt, dass sie eine Rolle bei der Hitzeschockantwort spielen. Das sechste Gen codiert für die *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase. In der Promotorregion des Gens konnten zwei Bindestellen von Phr durch EMSA-Experimente nachgewiesen werden.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten ROMA-System ist eine Methode etabliert worden, mit der es möglich ist, die Regulons weiterer Transkriptionsfaktoren von *Pyrococcus furiosus* zu definieren.

Der Transkriptionsregulator SurR wurde in Kooperation mit Dr. Gina Lipscomb (University of Georgia, Athens) charakterisiert. Dabei wurde das Protein durch *in vitro* Transkriptionen und Primer Extension-Experimente untersucht. Es konnte seine Funktion als Transkriptionsregulator und seine Rolle bei der Regulation der Expression von am Schwefelstoffwechsel beteiligten Genen nachgewiesen werden. Außerdem wurde festgestellt, dass es sowohl als Aktivator wie auch als Repressor wirkt. In *in vitro* Experimenten aktivierte SurR die Transkription der Gene der membrangebundenen Hydrogenase I und der beta-Untereinheit der Hydrogenase I und hemmte die Transkription der Gene der Proteindisulfid-Oxidoreduktase und der NAD(P)H abhängigen

Schwefelreduktase. Außerdem aktivierte SurR die Transkription seines eigenen Gens *in vitro*.

Es konnte in dieser Arbeit die Evidenz dafür erbracht werden, dass die Bindeaffinität von SurR durch einen Redoxschalter beeinflusst wird. Dabei handelt es sich um zwei Cysteine im N-terminalen wHTH-Motiv von SurR, deren SH-Gruppen eine Disulfidbindung ausbilden. Der Redoxzustand dieses CxxC-Motivs beeinflusst die Konformation der DNA-Bindedomäne. Dies bestätigten Untersuchungen der Kristallstruktur von SurR und einer SurR-Mutante, die von Dr. Gina Lipscomb durchgeführt wurden. Bei der Mutante wurden die Cysteine des CxxC-Motivs durch Alanine ausgetauscht. Somit konnte sie ihre Konformation nicht mehr ändern, sondern lag immer im „reduzierten“ Zustand vor. Durch Untersuchungen im zellfreien System konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass nur reduziertes SurR die Transkription beeinflusst. Dabei wurde kolloidaler Schwefel in Form von Polysulfidlösung als Oxidationsmittel in die *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Dadurch wurde SurR in die oxidierte Form überführt, und wie erwartet konnte oxidiertes SurR die Transkription nicht mehr regulieren.

VII Summary

The present work describes the characterisation of two transcription regulators of *Pyrococcus furiosus*. These are the heat shock regulator Phr and a regulator of the sulfur metabolism SurR.

A ROMA (run-off transcription-microarray analysis)-system was established for *Pyrococcus furiosus*. The combination of whole genome *in vitro* transcription and microarray-analysis provides the possibility to identify the regulons of different transcription regulators. For this project Phr was chosen as a model protein. The regulator was further characterised to determine its role in the heat shock response.

To examine all genes simultaneously an *in vitro* transcription system was established using chromosomal DNA from *Pyrococcus furiosus* as template. The whole genome transcription was carried out in the presence and absence of Phr. For the identification of target genes the two types of *in vitro* RNA-pools had to be analysed. Using microarrays the basal and regulated transcription were compared. This was done in cooperation with Dr. Gerrit Schut (University of Georgia, Athens). For the microarray-analysis the *in vitro* transcribed RNA was labelled with fluorescent dyes and hybridized with a microarray. Using this ROMA-System for *Pyrococcus furiosus* six novel genes regulated by Phr were identified. These were: PF0624, PF1042, PF1291, PF1292, PF1488 and PF1616. Their promoter region was analysed in standard *in vitro* transcription experiments and the regulatory effect of Phr was proven for each gene in an independent assay.

The alignment of the novel genes defined a new Phr-binding site: '5-TTTAnnnACnnnnnGTnAnnAAA-3'. This binding site was used in an *in silico* genome analysis. This experiment showed that only the identified genes have a Phr-binding site downstream of the TATA-box overlapping the transcription start-site.

Five of the novel genes regulated by Phr are annotated as hypothetical proteins. This work showed that they are part of the heatshock response. The sixth gene encodes for the myo-inositol-phosphat-synthase (MIPS). EMSA-experiments detected two binding sites of Phr in the promoter region of the *mips* gene.

The ROMA-System provides the possibility for the identification of the regulons of further transcription regulators of *Pyrococcus furiosus*.

SurR was examined by *in vitro* transcription and primer extension-analysis. This work provides evidence that this protein is a transcription regulator and is involved in the regulation of genes of the sulfur metabolism. SurR regulates the transcription as an activator and as a repressor. *In vitro* experiments showed that the protein activates the transcription of the genes encoding the membrane-bound hydrogenase and the sulfhydrogenase beta subunit and represses the transcription of the genes encoding the protein disulfide oxidoreductase and the NAD(P)H-dependant sulfur reductase. SurR also activated the transcription of its own gene *in vitro*.

Furthermore this work substantiated that the binding activity of SurR is affected by a redoxswitch. This involves two cysteines of the N-terminal wHTH-Motiv of SurR, which SH-groups form a disulfidbond. The redox-potential of this CxxC-motif affects the conformation of the DNA-binding site. SurR and a SurR-Mutant were analysed by *in vitro* transcription assays. In the SurR-mutant the cysteines of the CxxC-Motiv were exchanged by alanines, so that this protein was fixed in the "redox conformation". *In vitro* transcription experiments showed that only reduced SurR acts as regulator. Therefore colloidal sulfur in form of polysulfid solution was used as oxidant reagent in the cell-free

reaction. The transcription regulator SurR was characterized in cooperation with Dr. Gina Lipscomb (University of Georgia, Athens).

VIII Literaturverzeichnis

- Abella, M., Rodriguez, S., Paytubi, S., Campoy, S., White, M. F., and Barbe, J. (2007). The *Sulfolobus solfataricus* radA paralogue sso0777 is DNA damage inducible and positively regulated by the Stal protein. *Nucleic Acids Res* **35**, 6788-97.
- Adams, M. W., Holden, J. F., Menon, A. L., Schut, G. J., Grunden, A. M., Hou, C., Hutchins, A. M., Jenney, F. E., Jr., Kim, C., Ma, K., Pan, G., Roy, R., Sapra, R., Story, S. V., and Verhagen, M. F. (2001). Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* **183**, 716-24.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Bailey, T. L., and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28-36.
- Baliga, N. S., and DasSarma, S. (1999). Saturation mutagenesis of the TATA box and upstream activator sequence in the haloarchaeal bop gene promoter. *J Bacteriol* **181**, 2513-8.
- Baliga, N. S., Kennedy, S. P., Ng, W. V., Hood, L., and DasSarma, S. (2001). Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2521-5.
- Bartlett, M. S. (2005). Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr Opin Microbiol* **8**, 677-84.
- Bauer, M., Marschall, L., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2008). Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic Acids Res* **36**, 598-606.
- Belkin, S., Wirsén, C. O., and Jannasch, H. W. (1985). Biological and Abiological Sulfur Reduction at High Temperatures. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1057-1061.
- Bell, S. D. (2005). Archaeal transcriptional regulation--variation on a bacterial theme? *Trends Microbiol* **13**, 262-5.
- Bell, S. D., Cairns, S. S., Robson, R. L., and Jackson, S. P. (1999). Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro. *Mol Cell* **4**, 971-82.
- Bell, S. D., and Jackson, S. P. (1998). Transcription in Archaea. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 41-51.
- Bell, S. D., and Jackson, S. P. (2000a). Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J Biol Chem* **275**, 31624-9.

- Bell, S. D., and Jackson, S. P. (2000b). The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* **275**, 12934-40.
- Bell, S. D., and Jackson, S. P. (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol* **4**, 208-13.
- Bell, S. D., Magill, C. P., and Jackson, S. P. (2001). Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochem Soc Trans* **29**, 392-5.
- Bikandi, J., San Millan, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **20**, 798-9.
- Borges, N., Goncalves, L. G., Rodrigues, M. V., Siopa, F., Ventura, R., Maycock, C., Lamosa, P., and Santos, H. (2006). Biosynthetic pathways of inositol and glycerol phosphodiesterases used by the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* in stress adaptation. *J Bacteriol* **188**, 8128-35.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brinkman, A. B., Bell, S. D., Lebbink, R. J., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2002). The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J Biol Chem* **277**, 29537-49.
- Brinkman, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J. H., Thomm, M., de Vos, W. M., and van Der Oost, J. (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem* **275**, 38160-9.
- Campbell, E. A., Westblade, L. F., and Darst, S. A. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr Opin Microbiol* **11**, 121-7.
- Cao, M., and Helmann, J. D. (2004). The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigmaX factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **186**, 1136-46.
- Cao, M., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Wu, M. F., Paddon, C., and Helmann, J. D. (2002). Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* **316**, 443-57.
- Cao, M., Salzberg, L., Tsai, C. S., Mascher, T., Bonilla, C., Wang, T., Ye, R. W., Marquez-Magana, L., and Helmann, J. D. (2003). Regulation of the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function protein sigma(Y) and its target promoters. *J Bacteriol* **185**, 4883-90.

- Dahlke, I., and Thomm, M. (2002). A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Res* **30**, 701-10.
- Enoru-Eta, J., Gigot, D., Glansdorff, N., and Charlier, D. (2002). High resolution contact probing of the Lrp-like DNA-binding protein Ss-Lrp from the hyperthermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus* P2. *Mol Microbiol* **45**, 1541-55.
- Fiala, G. and Stetter, K.O. (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov represents a novel genus of marine heterotrophic archaebacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* **145**, 56-61
- Geiduschek, E. P., and Ouhammouch, M. (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Mol Microbiol* **56**, 1397-407.
- Goncalves, L. G., Lamosa, P., Huber, R., and Santos, H. (2008). Di-myo-inositol phosphate and novel UDP-sugars accumulate in the extreme hyperthermophile *Pyrolobus fumarii*. *Extremophiles* **12**, 383-9.
- Hausner, W., and Thomm, M. (2001). Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. *J Bacteriol* **183**, 3025-31.
- Hethke, C., Geerling, A. C., Hausner, W., de Vos, W. M., and Thomm, M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **24**, 2369-76.
- Hofacker, A., Schmitz, K. M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S., and Pfeifer, F. (2004). GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* **150**, 1829-38.
- Kamyschny, A., Jr., Gun, J., Rizkov, D., Voitsekovski, T., and Lev, O. (2007). Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at different temperatures by rapid single phase derivatization. *Environ Sci Technol* **41**, 2395-400.
- Kanai, T., Akerboom, J., Takedomi, S., van de Werken, H. J., Blombach, F., van der Oost, J., Murakami, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007). A global transcriptional regulator in *Thermococcus kodakaraensis* controls the expression levels of both glycolytic and gluconeogenic enzyme-encoding genes. *J Biol Chem* **282**, 33659-70.
- Kessler, A., Sezonov, G., Guijarro, J. I., Desnoues, N., Rose, T., Delepierre, M., Bell, S. D., and Prangishvili, D. (2006). A novel archaeal regulatory protein, Stal, activates transcription from viral promoters. *Nucleic Acids Res* **34**, 4837-45.
- Kleinjan, W. E., de Keizer, A., and Janssen, A. J. (2005). Kinetics of the chemical oxidation of polysulfide anions in aqueous solution. *Water Res* **39**, 4093-100.
- Kruger, K., Hermann, T., Armbruster, V., and Pfeifer, F. (1998). The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J Mol Biol* **279**, 761-71.

- Laksanalamai, P., and Robb, F. T. (2004). Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles* **8**, 1-11.
- Laksanalamai, P., Whitehead, T. A., and Robb, F. T. (2004). Minimal protein-folding systems in hyperthermophilic archaea. *Nat Rev Microbiol* **2**, 315-24.
- Lee, S. J., Moulakakis, C., Koning, S. M., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2005). TrmB, a sugar sensing regulator of ABC transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promoter specificity and is controlled by different inducers. *Mol Microbiol* **57**, 1797-807.
- Lee, S. J., Surma, M., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2008). The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch Microbiol* **190**, 247-56.
- Lee, S. J., Surma, M., Seitz, S., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2007a). Characterization of the TrmB-like protein, PF0124, a TGM-recognizing global transcriptional regulator of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Mol Microbiol* **65**, 305-18.
- Lee, S. J., Surma, M., Seitz, S., Hausner, W., Thomm, M., and Boos, W. (2007b). Differential signal transduction via TrmB, a sugar sensing transcriptional repressor of *Pyrococcus furiosus*. *Mol Microbiol* **64**, 1499-505.
- Lie, T. J., and Leigh, J. A. (2003). A novel repressor of *nif* and *glnA* expression in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol Microbiol* **47**, 235-46.
- Lie, T. J., Wood, G. E., and Leigh, J. A. (2005). Regulation of *nif* expression in *Methanococcus maripaludis*: roles of the euryarchaeal repressor NrpR, 2-oxoglutarate, and two operators. *J Biol Chem* **280**, 5236-41.
- Lipscomb, G. L. (2007). A novel redox-sensitive transcriptional regulator involved in *Pyrococcus furiosus* sulfur response, Dissertation, University of Georgia
- Lipscomb, G. L., Keese, A. M., Cowart, D. M., Schut, G. J., Thomm, M., Adams, M. W., and Scott, R. A. (2009). SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Mol Microbiol* **71**, 332-49.
- Liu, W., Vierke, G., Wenke, A. K., Thomm, M., and Ladenstein, R. (2007). Crystal structure of the archaeal heat shock regulator from *Pyrococcus furiosus*: a molecular chimera representing eukaryal and bacterial features. *J Mol Biol* **369**, 474-88.
- Lopez-Garcia, P., Knapp, S., Ladenstein, R., and Forterre, P. (1998). In vitro DNA binding of the archaeal protein Sso7d induces negative supercoiling at temperatures typical for thermophilic growth. *Nucleic Acids Res* **26**, 2322-8.
- MacLellan, S. R., Eiamphungporn, W., and Helmann, J. D. (2009). ROMA: an in vitro approach to defining target genes for transcription regulators. *Methods* **47**, 73-7.

- Martins, L. O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K. O., Da Costa, M. S., and Santos, H. (1997). Organic Solutes in Hyperthermophilic Archaea. *Appl Environ Microbiol* **63**, 896-902.
- Martins, L. O., and Santos, H. (1995). Accumulation of Mannosylglycerate and Di-myo-Inositol-Phosphate by *Pyrococcus furiosus* in Response to Salinity and Temperature. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3299-3303.
- Napoli, A., van der Oost, J., Sensen, C. W., Charlebois, R. L., Rossi, M., and Ciaramella, M. (1999). An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. *J Bacteriol* **181**, 1474-80.
- Ouhammouch, M., Dewhurst, R. E., Hausner, W., Thomm, M., and Geiduschek, E. P. (2003). Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5097-102.
- Ouhammouch, M., Langham, G. E., Hausner, W., Simpson, A. J., El-Sayed, N. M., and Geiduschek, E. P. (2005). Promoter architecture and response to a positive regulator of archaeal transcription. *Mol Microbiol* **56**, 625-37.
- Pedone, E., Ren, B., Ladenstein, R., Rossi, M., and Bartolucci, S. (2004). Functional properties of the protein disulfide oxidoreductase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*: a member of a novel protein family related to protein disulfide-isomerase. *Eur J Biochem* **271**, 3437-48.
- Peeters, E., Thia-Toong, T. L., Gigot, D., Maes, D., and Charlier, D. (2004). Ss-LrpB, a novel Lrp-like regulator of *Sulfolobus solfataricus* P2, binds cooperatively to three conserved targets in its own control region. *Mol Microbiol* **54**, 321-36.
- Poole, F. L., 2nd, Gerwe, B. A., Hopkins, R. C., Schut, G. J., Weinberg, M. V., Jenney, F. E., Jr., and Adams, M. W. (2005). Defining genes in the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: implications for all microbial genomes. *J Bacteriol* **187**, 7325-32.
- Reeve, J. N., Bailey, K. A., Li, W. T., Marc, F., Sandman, K., and Soares, D. J. (2004). Archaeal histones: structures, stability and DNA binding. *Biochem Soc Trans* **32**, 227-30.
- Ren, B., Tibbelin, G., de Pascale, D., Rossi, M., Bartolucci, S., and Ladenstein, R. (1998). A protein disulfide oxidoreductase from the archaeon *Pyrococcus furiosus* contains two thioredoxin fold units. *Nat Struct Biol* **5**, 602-11.
- Rodrigues, M. V., Borges, N., Henriques, M., Lamosa, P., Ventura, R., Fernandes, C., Empadinhas, N., Maycock, C., da Costa, M. S., and Santos, H. (2007). Bifunctional CTP:inositol-1-phosphate cytidyltransferase/CDP-inositol:inositol-1-phosphate transferase, the key enzyme for di-myo-inositol-phosphate synthesis in several (hyper)thermophiles. *J Bacteriol* **189**, 5405-12.
- Rohlin, L., Trent, J. D., Salmon, K., Kim, U., Gunsalus, R. P., and Liao, J. C. (2005). Heat shock response of *Archaeoglobus fulgidus*. *J Bacteriol* **187**, 6046-57.

- Scheuch, S., and Pfeifer, F. (2007). GvpD-induced breakdown of the transcriptional activator GvpE of halophilic archaea requires a functional p-loop and an arginine-rich region of GvpD. *Microbiology* **153**, 947-58.
- Scholz, S., Sonnenbichler, J., Schafer, W., and Hensel, R. (1992). Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett* **306**, 239-42.
- Schut, G. J., Brehm, S. D., Datta, S., and Adams, M. W. (2003). Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: *Pyrococcus furiosus* grown on carbohydrates or peptides. *J Bacteriol* **185**, 3935-47.
- Schut, G. J., Bridger, S. L., and Adams, M. W. (2007). Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: characterization of a coenzyme A- dependent NAD(P)H sulfur oxidoreductase. *J Bacteriol* **189**, 4431-41.
- Shockley, K. R., Ward, D. E., Chhabra, S. R., Connors, S. B., Montero, C. I., and Kelly, R. M. (2003). Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2365-71.
- Soding, J., Remmert, M., Biegert, A., and Lupas, A. N. (2006). HHsenser: exhaustive transitive profile search using HMM-HMM comparison. *Nucleic Acids Res* **34**, W374-8.
- Thomm, M. (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 159-71.
- Thomm, M., Reich, C., Grunberg, S., and Naji, S. (2009). Mutational studies of archaeal RNA polymerase and analysis of hybrid RNA polymerases. *Biochem Soc Trans* **37**, 18-22.
- Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C., and Thomm, M. (2003). A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *J Biol Chem* **278**, 18-26.
- Vierke, G. (2006). Die Hitzeschockantwort oberhalb des Siedepunktes von Wasser: Funktion und Struktur des neuartigen Transkriptionsregulators Phr aus *Pyrococcus furiosus*, Doktorarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4576-9.
- Xie, Y., and Reeve, J. N. (2005). Regulation of tryptophan operon expression in the archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *J Bacteriol* **187**, 6419-29.
- Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J. L., and Minchin, S. D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* **32**, 5874-93.

Zheng, M., and Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol* 59, 1-6.

Zimmermann, P., and Pfeifer, F. (2003). Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. *Mol Microbiol* 49, 783-94.

IX Anhang

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRE	Faktor B Recognition Element
BSA	Bovine Serum Albumin
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
CoA	Coenzyme A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
et al.	et alii
gdh	Glutamatdehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HTH	helix turn helix
kb	Kilobasen (-paare)
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Phr	Pyrococcus heat shock regulator
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotid Kinase
poly[d(I-C)]	Poly-desoxy-Cytosin-desoxy-Inosin
p.a.	pro analysi
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA Polymerase
rpm	rounds per minute

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SSC	saline-sodium-citrate
SurR	Sulfur response regulator
Tab	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
TFE	Transkriptionsfaktor E
U	Unit
wHTH	winged helix turn helix

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin
T	Desoxythymidin

Symbole für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
M	Met	Methionin			

2. Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Thomm für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Sein stetiges Interesse und seine große Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich auch für das Ermöglichen meiner Aufenthalte an der Universität von San Diego und an der Universität von Georgia während meiner Zeit als Doktorandin.

Herrn Dr. Gerrit Schut und Herrn Prof. Dr. Mike Adams vom *Department of Biochemistry and Molecular Biology* der *University of Georgia* in Athens, USA danke ich sehr für ihre Gastfreundschaft während meiner Zeit in ihrem Labor und für die erfolgreiche Kooperation.

Frau Dr. Gina Lipscomb danke ich ebenfalls für die hervorragende Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Mohamed Ouhammouch und Herrn Prof. Dr. Peter Geiduschek von der *Division of Biological Sciences* der *University of California* in San Diego, USA danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor und ihre große Unterstützung.

Bei Herrn PD Dr. Rainer Merkl bedanke ich mich für die wertvollen Ratschläge bei der BLAST-Analyse.

Meinen Laborkollegen Melanie Surma, Dr. Souad Naji und Wolfgang Forster danke ich für die fröhliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Ein herzlicher Dank geht an alle Kollegen und Mitarbeiter des *Lehrstuhls für Mikrobiologie und Archaeenzentrum* in Regensburg für die schöne Zeit und die große Hilfsbereitschaft.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanke ich mich herzlich für ihre liebevolle Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.

3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Lipscomb, G. L., Keese, A. M., Cowart, D. M., Schut, G. J., Thomm, M., Adams, M. W., and Scott, R. A. (2009). SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Mol Microbiol* **71**, 332-49.

Regensburg, im Februar 2009